

Untersuchung zur spezifischen
radioimmunologischen Bestimmung
von Humanchoriongonadotropin

Thomas Hellmann

Diss. München
1984





Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK II DES KLINIKUMS GROSSHADERN
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
DIREKTOR: PROF. DR. G. PAUMGARTNER

UNTERSUCHUNG ZUR SPEZIFISCHEN RADIOIMMUNOLOGISCHEN
BESTIMMUNG VON HUMANCHORIONGONADOTROPIN

Inaugural Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Thomas Hellmann

aus

München

1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. K. Mann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. G. Paumgartner

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.3.84

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALT

1. Einleitung	1
2. Die Familie	2
3. Die Eltern	3
4. Die Kinder	4
5. Die Großeltern	5
6. Die Verwandten	6
7. Die Freunde	7
8. Die Lehrer	8
9. Die Hobbys	9
10. Die Reisen	10
11. Die Feste	11
12. Die Krankheiten	12
13. Die Tode	13
14. Die Bestattungen	14
15. Die Erben	15
16. Die Steuern	16
17. Die Versicherungen	17
18. Die Renten	18
19. Die Sozialleistungen	19
20. Die Arbeitslosenversicherung	20
21. Die Krankenkasse	21
22. Die Pflegeversicherung	22
23. Die Unfallversicherung	23
24. Die Haftpflichtversicherung	24
25. Die Lebensversicherung	25
26. Die Vermögensverwaltung	26
27. Die Altersvorsorge	27
28. Die Rente	28
29. Die Sozialhilfe	29
30. Die Grundsicherung	30
31. Die Arbeitsagentur	31
32. Die Bundesagentur für Arbeit	32
33. Die Bundesagentur für Arbeit - Statistik	33
34. Die Bundesagentur für Arbeit - Ausbildung	34
35. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsplätze	35
36. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitslosenquote	36
37. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarkt	37
38. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktbericht	38
39. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktstudie	39
40. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktanalyse	40
41. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktprognose	41
42. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation	42
43. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2019	43
44. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2020	44
45. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2021	45
46. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2022	46
47. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2023	47
48. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2024	48
49. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2025	49
50. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2026	50
51. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2027	51
52. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2028	52
53. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2029	53
54. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2030	54
55. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2031	55
56. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2032	56
57. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2033	57
58. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2034	58
59. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2035	59
60. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2036	60
61. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2037	61
62. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2038	62
63. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2039	63
64. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2040	64
65. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2041	65
66. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2042	66
67. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2043	67
68. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2044	68
69. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2045	69
70. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2046	70
71. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2047	71
72. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2048	72
73. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2049	73
74. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2050	74
75. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2051	75
76. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2052	76
77. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2053	77
78. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2054	78
79. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2055	79
80. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2056	80
81. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2057	81
82. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2058	82
83. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2059	83
84. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2060	84
85. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2061	85
86. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2062	86
87. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2063	87
88. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2064	88
89. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2065	89
90. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2066	90
91. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2067	91
92. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2068	92
93. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2069	93
94. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2070	94
95. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2071	95
96. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2072	96
97. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2073	97
98. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2074	98
99. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2075	99
100. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2076	100
101. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2077	101
102. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2078	102
103. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2079	103
104. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2080	104
105. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2081	105
106. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2082	106
107. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2083	107
108. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2084	108
109. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2085	109
110. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2086	110
111. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2087	111
112. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2088	112
113. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2089	113
114. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2090	114
115. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2091	115
116. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2092	116
117. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2093	117
118. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2094	118
119. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2095	119
120. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2096	120
121. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2097	121
122. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2098	122
123. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2099	123
124. Die Bundesagentur für Arbeit - Arbeitsmarktsituation 2100	124

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. <u>EINLEITUNG</u>	1
2. <u>FRAGESTELLUNG</u>	3
3. <u>STRUKTUR VON HCG</u>	4
4. <u>MATERIALIEN</u>	7
4.1. Antiseren	7
4.2. Hormonpräparate	8
4.3. Geräte und Material	9
4.4. Reagenzien	10
4.5. Pufferlösungen	10
5. <u>METHODEN</u>	12
5.1. Radioaktive Markierung von hCG und hCG- β	12
5.1.1. Chloramin T-Methode	12
5.1.2. Iodo Gen TM -Methode	13
5.2. Reinigung des markierten Hormons	15
5.2.1. Trennung des Tracers vom freien NaI-125	15
5.2.2. Nachreinigung	16
5.3. Spezifische Aktivität des Tracers	17
5.4. Immunreaktivität von ^{125}I -hCG und ^{125}I -hCG- β	18
5.5. Stabilität des Tracers	19
5.6. Durchführung der Radioimmunoassays	20
5.7. Auswertung der Assays	22
5.8. Spezifität	22

	Seite
5.9. Qualitätskontrollen	23
5.10. Graphische Auswertung	25
5.11. Berechnung der physiologischen Halbwertzeit von hCG	25
5.12. Bindungsverhalten von hCG an Con A-Sepharose	25
6. <u>ERGEBNISSE</u>	27
6.1. Radioaktive Markierung von hCG	27
6.2. Herstellung des hCG- β -Tracers	37
6.3. Titer der untersuchten Antiseren	44
6.4. Inkubationszeit der Assays	45
6.5. Spezifität der Antiseren	46
6.6. Qualitätskontrollen	50
6.7. Eigenschaften des hCG/hCG- β RIA	52
6.8. Radioimmunoassay zur Bestimmung der hCG- β Untereinheit	53
6.9. Normal- und Referenzbereich für hCG und hCG- β	56
6.10. Abklingzeiten von hCG bei Schwangeren post partum	58
6.11. Bindungsverhalten von Tumor- und Schwangerenserum sowie Fruchtwasser an Con A-Sepharose	59
7. <u>DISKUSSION</u>	63
7.1. Radioaktive Markierung	63
7.2. Spezifität	65
7.3. Referenzpräparate	69
7.4. Physiologische Abklingzeit von hCG in Vivo	70

	Seite
7.5. Normalbereich von hCG und hCG- β	72
7.6. Molekulare Heterogenität von hCG	73
8. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	77
9. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	79

1. Einleitung

Bereits 1930 konnte Zondek im Urin eines Patienten mit malignem Hodentumor eine positive Schwangerschaftsreaktion nachweisen. Für maligne Keimzelltumore erlangte jedoch das Schwangerschaftshormon hCG erst eine größere klinische Bedeutung, als empfindliche radioimmunologische Bestimmungsmethoden entwickelt wurden. Antiseren, die gegen das gesamte hCG-Molekül gerichtet waren, wiesen allerdings eine ausgeprägte Kreuzreaktion mit dem hypophysären Hormon Lutropin (hLH), in geringerem Ausmaß auch mit den anderen Glykoproteinhormonen FSH und TSH auf, so daß eine spezifische Bestimmung von hCG zu dieser Zeit nicht möglich war. Erst die Immunisierung von Kaninchen mit der isolierten β -Untereinheit von hCG führte zu einer Verbesserung der Spezifität (Vaitukaitis et al. 1971).

Inzwischen sind einige modifizierte Radioimmunoassays, die solche Antiseren einsetzen, beschrieben (Kardana & Bagshawe 1976; Tyrey & Hammond 1975; Yoshimoto et al. 1977; Kawamura et al. 1978; Mann et al. 1980 b). Verschiedene Arbeiten, die das hCG- β -Antiserum SB 6 (hergestellt von Vaitukaitis 1972, zu beziehen über NIAMDD) verwendeten, ließen jedoch auch Zweifel an der Spezifität dieses Antikörpers aufkommen. Bei Patienten mit erhöhten LH-Spiegeln fanden sich nämlich auch erhöhte hCG-Werte. Außerdem wurden falsch positive hCG-Befunde bei Kranken mit malignen Tumoren beschrieben (Lätheenmäki 1978, Mann et al. 1980 b, Rutanen & Seppälä 1978, Schüssler et al. 1978, Seppälä et al. 1978). Dabei konnte gezeigt werden, daß LH, dessen β -Untereinheit zu 80 % mit der von hCG strukturhomolog ist, als kreuzreagierende Substanz mitgemessen wurde. Durch die unterschiedliche Spezifität heute zur Verfügung stehender Antiseren war die Vergleichbar-



keit der Hormonbestimmungen verschiedener Labors erschwert. Wir haben deshalb einige der für eine breite Anwendung in Frage kommenden Antiseren in heterologen und homologen Radioimmunoassay-Systemen hinsichtlich ihrer Spezifität untersucht.

2. Fragestellung

Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines spezifischen und sensitiven Radioimmunoassays zum Nachweis von hCG als Tumormarker. Hierzu wurden folgende Punkte im Einzelnen untersucht:

1. Radioaktive Markierung von hCG und seiner β -Untereinheit mit ^{125}Jod und deren chromatographische Reinigung.
2. Überprüfung der Spezifität verschiedener Antiseren.
3. Standardisierung und Qualitätskontrolle von hCG-Radioimmunoassays.
4. Bestimmung der physiologischen Abklingrate (Halbwertszeit) von hCG post partum.
5. Bindungsverhalten von hCG aus Tumorseren und aus Schwangerenseren an Concanavalin A zur Ermittlung von Strukturvarianten von Tumor-hCG.

3. Struktur von HCG

HCG ist ein Glykoproteinormon mit einem Molekulargewicht von 38000.

Der Proteinanteil (70 %) besteht wie bei den anderen Glykoproteinormonen LH, TSH und FSH, aus einer alpha- und einer β -Untereinheit. Die Aminosäuresequenz ist aufgeklärt (Bahl et al. 1972). Die beiden Untereinheiten sind nicht-kovalent miteinander verbunden.

HCG-alpha besitzt ein Molekulargewicht von 14700 (Proteinanteil 10000, Kohlenhydratanteil 4700) und unterscheidet sich kaum von der alpha-Kette von LH, TSH und FSH. Obwohl biologisch selbst inaktiv, ist seine strukturelle Intaktheit Voraussetzung, um sich mit der β -Untereinheit zum biologisch aktiven Hormon zu verbinden (Bellisario et al. 1975, Merz et al. 1974).

Das Molekulargewicht von hCG- β beträgt 23000 (Proteinanteil 16000). Die 115 aminoterminalen Aminosäuren von hCG- β und LH- β sind zu 80 % strukturhomolog. Dies erklärt die ähnlichen immunologischen Eigenschaften gerade dieser beiden Hormone (Closset 1973, Shome 1973). HCG- β besitzt zusätzlich 32 C-terminale Aminosäuren, die bei keinem anderen Glykoproteinormon vorkommen und eine starke Antigen determinante darstellen. Zwischen hCG- β und den β -Untereinheiten von TSH und FSH besteht eine geringere Ähnlichkeit (Saxena et al. 1976, Shome et al. 1974). Sie kreuzreagieren daher in geringerem Umfang mit hCG.

HCG hat einen Kohlenhydrat-Anteil von 33 %. Er setzt sich aus 7 Monosaccharideinheiten zusammen, von denen 2 an die alpha-Untereinheit und 5 an die β -Kette gebunden sind.

Die Bestandteile der Monosaccharideinheiten sind folgende 6 Zucker: Sialinsäure, L-Fucose, D-Galactose, D-Mannose, N-Acetylglucosamin und N-Acetylgalactosamin (Bahl et al. 1969, Bahl et al. 1973). Obwohl der Kohlenhydratanteil selbst keine Antigendeterminante darstellt, hat er indirekt dennoch einen Einfluß auf die Immuneigenschaft, da er die Konformation des Moleküls wesentlich mitbestimmt.

Auch die Spezifität mancher Antiseren ist zum Teil konformationsabhängig. Die biologische Aktivität von hCG hängt wesentlich von der Intaktheit des Kohlenhydratanteils ab. Über die biologische Wirkung von hCG, das durch Tumoren gebildet wird, ist wenig bekannt. Strukturvarianten hinsichtlich des Protein- und KH-Anteils sind nur in Einzelfällen beschrieben. Da differenzierte Strukturanalysen des KH-Anteils von Tumor-hCG bisher nicht möglich waren, überprüften wir das Bindungsverhalten von Tumor-hCG an das Pflanzenlectin Concanavalin A, das bevorzugt Kohlenhydrate und damit auch Glykoproteine bindet, als indirekten Hinweis auf strukturelle Unterschiede zum Schwangeren-hCG.

Tab. 1: Eigenschaften von hCG und seinen Untereinheiten
(nach Bahl 1977)

Eigenschaft	hCG	hCG- α	hCG- β
Molekulargewicht ¹⁾	38000	15000	23000
% Kohlenhydrat	33	33	33
Anzahl der Aminosäuren	239	92	147
Anzahl der Zuckerreste	57-65	22-26	35-39
Anzahl der Kohlenhydrat- einheiten	7	2	5
Biologische Aktivität IU/mg ²⁾	11000		
% Bindungsaktivität	100		
% Immunologische Aktivität	100	1-2	10

1) Bestimmt aus der Aminosäuresequenz und der Kohlenhydratzusammensetzung der α - und β -Kette.

2) Bestimmt mittels Bioassay.

4. Materialien

4.1. Antiseren

a) Antiseren zur Bestimmung von hCG

- Das von Vaitukaitis et al. (1971) entwickelte Antiserum SB 6 erhielten wir von der National Pituitary Agency, Baltimore, Maryland (NIAMDD) in lyophilisierter Form. Daneben wurden uns folgende kommerzielle Antikörper zur Verfügung gestellt:
- Anti-hCG-B C-2333-3D, lyophilisiert, der Fa. Serono, Freiburg;
- Anti-hCG AS 15, Batch-Nr. 57, lyophilisiert, des Institut National des Radioéléments, (IRE), Fleurus, Belgien, (Reuter 1974);
- Anti-hCG-B, Lot-Nr. A5356, lyophilisiert, der Radioassay System Laboratories (RSL) Inc. Carson, USA, (Vertrieb: Fa. Biosigma, München).

b) Antiserum zur Bestimmung der B-Untereinheit von hCG:

- Anti-hCG-B AS 16, Batch-Nr. hCG-B 32, lyophilisiert, Institut National des Radioéléments (IRE), Fleurus, Belgien.

Alle Antiseren wurden in Puffer E gelöst und portioniert bei - 40° C aufbewahrt.

c) Präzipitierendes Anti-Kaninchen-Gammaglobulin-Serum (Doppelantikörper)

Zur Herstellung des Doppelantikörpers gingen wir nach der Methode von Morgan et al. (1963) und Hales et al. (1963) in modifizierter Form vor.

Ein mg Kaninchengammaglobulin, 5 mg Mycobakt. tub. 437 A RA, 1 ml kompl. Freund'sches Adjuvans und 1 ml sterile physiologische Kochsalzlösung wurden gemischt. Die Suspension wurde einer 2 Jahre alten Ziege an 8 Stellen intrakutan injiziert.

Ein und zwei Monate nach der Grundimmunisierung wurde mit 0,5 mg Antigen in kompl. Freund'schen Adjuvans geboostert.

10 Tage nach jeder Injektion wurde der Antikörpertiter durch Doppeldiffusionstechnik nach Ouchterlony geprüft.

10 Tage nach der 2. Boosterung lag der Titer bei 1:64.

Wir verwendeten den Doppelantikörper im RIA in einer Verdünnung von 1:40. Das Antiserum wurde unverdünnt in 10 ml-Portionen bei - 40° C aufbewahrt.

4.2. Hormonpräparate

HCG 2nd International Standard (5300 IU/Ampulle) und hCG 1st International Reference Preparation (IRP) (650 IU/Ampulle) bezogen wir von der WHO International Laboratory for Biological Standards, National Institute for Biological Standards and Control, Holly Hill, Hampstead, London.

HCG (CR-115), hCG-B (CR-115-B), hLH (LER 960), hFSH (HS1) erhielten wir von der National Pituitary Agency (NIAMDD), Bethesda, USA.

HTSH (Lot-Nr. 860129) und hLH-B (Lot-Nr. 389563) stammt von der Firma Calbiochem, San Diego, Calif., USA.

Alle Hormonpräparate wurden in Puffer B gelöst, portioniert und bei -40°C aufbewahrt.

4.3. Geräte und Material

Gammascint Bf 5300	Berthold, Wildbad
Teletype 3320 WA	Berthold, Wildbad
Eppendorf F Diluter 5203	Eppendorf Hamburg
Härens-Christ Zentrifuge, Typ 4121	Härens-Christ, Osterode
Strahlungsmeßgerät LB 2040	Berthold
Fraktionssammler E 6000 C	Ismatec SA, Zürich
Fraktionssammler 2112 Redirac	LKB, Bromka
Zentrifuge 3200	Eppendorf
Rotationsmischer 3300	Eppendorf
Rotationsmischer ¹⁾	Cenco, Niederlande
Parafilm M	American Can Company, USA
Pipetten	Eppendorf
Glaswolle, reinst, silanisiert, für Gaschromatographie	Serva, Heidelberg
Pasteur Kapillarpipetten 150 mm	WU, Mainz
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf Hamburg

4.4. Reagenzien

Rinderserumalbumin BSA	Roth Karlsruhe
Kaninchenserum stabilisiert	Behringwerke Marburg
1 ml	
Kompl. und inkompl. Freund'sches Adjuvans	Difco Lab. Detroit
KH_2PO_4	Fa. Merck
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Fa. Merck
NaCl	Fa. Merck
NaOH 0,1 mol	Fa. Merck
HCl 0,1 mol	Fa. Merck
Kaliumjodid	Fa. Merck
Chloramin T	Fa. Merck
Biogel P6	Bio-Rad München
Biogel P60	Bio-Rad München
Con A-Sepharose, 100 ml	Pharmacia, Uppsala
Sephadex SP 25 0	Pharmacia, Uppsala
Ultrogel AcA 44	LKB
Natrium- $^{125}\text{Jodid}$	Behringwerke Marburg
Iodo-Gen TM	Fa. Pierce Eurochemie Rotterdam
Methyl-alpha-D-Glucopyranosid, 250 g Glycin	Serva Heidelberg
Silikonlösung, 100 ml	Serva Heidelberg

4.5. Pufferlösungen

- A: 0,4 mol/l KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , pH 7,5
 B: 0,05 mol/l KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , 0,1 mol/l NaCl , pH 7,5
 C: 0,05 mol/l KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , 0,1 mol/l NaCl , 2 g/l bovines Serumalbumin, pH 7,5
 D: 0,01 mol/l KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , 0,15 mol/l NaCl , 10 g/l

- bovines Serumalbumin, 0,01 mol/l EDTA, pH 7,5
- E: 0,05 mol/l KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , 0,1 mol/l NaCl, 1 g/l bovines Serumalbumin, pH 7,5
- F: 0,05 mol/l KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , 0,1 mol/l NaCl, 10 g/l bovines Serumalbumin, pH 7,5
- G: Puffer B + 0,2 mol/l Methyl-alpha-D-Glucopyranosid
- H: Puffer B + 1,0 mol/l Methyl-alpha-D-Glucopyranosid
- I: 0,01 mol/l Glycin, pH 3
- K: 0,05 mol/l KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 ; 0,15 mol/l NaCl
0,0025 mol/l Calciumchlorid, pH 7,5

Jedem Puffer wurde 0,2 g/l Na-azid zugegeben.

5. Methoden

5.1. Radioaktive Markierung von hCG und hCG- β

Zur Markierung von hCG und seiner β -Untereinheit verwendeten wir zwei verschiedene Methoden in modifizierter Form:

Die Chloramin-T-Methode nach Greenwood und Hunter (1963), modifiziert nach Mann et al. (1980) und die Iodo-GenTM-Methode, die von einigen Autoren als besonders schonende Methode angegeben wird (Ferguson and Jeffcoate, 1979, Wood et al. 1980).

5.1.1. Chloramin-T-Methode

Diese Methode wird am häufigsten zur Tracerherstellung für Radioimmunoassays verwendet. Natrium ¹²⁵Jodid wird durch Chloramin-T in Anwesenheit des zu markierenden Proteins oxidiert und nachfolgend das entstehende ¹²⁵Jodid in die Tyrosinreste des Proteins eingebaut. Nach Zugabe von Kaliumjodid als Träger für das ¹²⁵Jodid wird das markierte Protein vom freien Jodid abgetrennt.

1 mCi Naj-125 (= 5 μ l) wurden mit 70 μ l Puffer A verdünnt und davon 30 μ l (= 0,4 mCi) in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Nach Zugabe von 2,5 μ g Antigen, gelöst in 10 μ l Puffer B, und 10 μ l Puffer A wurde die Reaktion mit 30 μ g Chloramin-T, gelöst in 10 μ l Puffer B gestartet. Zur Unterstützung des Reaktionsablaufs wurde das Eppendorfgefäß 20 sec auf einem Rotationsmischer geschüttelt. Exakt nach dieser Zeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μ g Na₂S₂O₅, gelöst in 20 μ l Puffer B beendet. Wir verdünnten das Reaktionsgemisch mit 200 μ l Puffer C und übertrugen es auf eine Chromatographiesäule (s. u.) zur Trennung von

markiertem Hormon und freier Aktivität. Das Eppendorfggefäß wurde mit 0,5 mg Kaliumjodid (gelöst in 50 µl Aqua bidest.) nachgespült. Die Spülmenge pipettierten wir ebenfalls auf die Säule.

5.1.2. Iodo-GenTM-Methode

Die Markierung mit Iodo-GenTM ist, wie auch die Chloramin-T-Methode, eine chemische Oxidationsmethode.

1, 3, 4, 6-Tetrachloro-3 alpha, 6 alpha-diphenylglycoluril (Iodo-GenTM) ist eine annähernd wasserunlösliche, stabile Verbindung, die in der Festphase mit wässrigen Lösungen von Jodid und Proteinen reagiert und zum Einbau von ¹²⁵Jodid in den Proteinanteil des Hormons führt. Nebenreaktionen, wie zum Beispiel Hormonpolymerisation, sind dabei zu vernachlässigen.

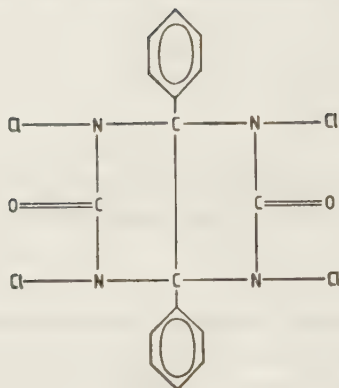


Abb. 1: Strukturformel von Iodo-GenTM (1, 3, 4, 6-Tetrachloro-3 alpha, 6 alpha-diphenylglycoluril).

Wir lösten 5 ug Iodo-GenTM mit 50 ul Chloroform in einem Eppendorfgefäß. Um das Iodo-GenTM als Niederschlag an der Wand des Reaktionsgefäßes haften zu lassen, ließen wir das Chloroform eine Stunde bei 22⁰ C abdampfen.

In das so vorbereitete Eppendorfgefäß gaben wir 0,5 mCi Na¹²⁵I (verdünnt mit 20 ul Puffer B) und 20 ul Puffer I. Der Start der Reaktion erfolgte mit der Zugabe von 2,5 ug Antigen (gelöst in 10 ul Puffer B). Nach 1 Min wurde das Reaktionsgemisch auf die Chromatographiesäule übertragen.

5.2. Reinigung des markierten Hormons

Die Auftrennung des Reaktionsgemisches in markiertes Hormon und ungebundenes Na ^{125}I und die Nachreinigung des daraus gewonnenen ^{125}I -Hormon-Peaks erfolgte durch Gel-, Ionenaustausch und/oder Affinitätschromatographie.

5.2.1. Trennung des Tracers von freiem NaJ- ^{125}I

Die Elimination von Na ^{125}I erreichten wir durch Gelchromatographie an einer mit Puffer C äquilibrierten Biogel P-6 Säule (1 x 13 cm) (Mann et al. 1980 a). Wir eluierten mit einem Druck von 15 cm H_2O mit Puffer B und sammelten 800 μl -Fraktionen in Eppendorfgläsern. Um einer Bindung des Hormons an die Gefäßwand vorzubeugen, wurden je 200 μl Puffer C vorgelegt. Hierbei folgt freies Na ^{125}I dem Hormongipfel.

Nach Markierung mit der IodoGenTM-Methode kam die Ionenaustauschchromatographie an dem Kationenaustauscher Sephadex-SP-C 25 zur Anwendung. Ein ml Gel wurde in eine 2 ml-Plastikspritze gepackt. Während der Elution mit dem sauren Puffer I (pH 3) band das anionische Hormon an den Kationenaustauscher und wurde durch den nachfolgenden Puffer B (pH 7,5) wieder von der Säule gelöst. Dabei folgte also der Hormonpeak dem ungebundenen Na ^{125}I . Wir sammelten 500 μl -Fraktionen in Eppendorfgläsern, in die 200 μl Puffer C vorgegeben worden waren.

5.2.2. Weitere Reinigung des Tracers (Nachreinigung)

Um den Tracer möglichst rein zu erhalten wurden die Hormon-Spitzenfraktionen über eine Biogel P-60 Säule (1,5 x 59 cm), die mit Puffer E äquilibriert wurde, rechromatographiert. Die Fraktionen (1 ml) des aufsteigenden, des absteigenden Schenkels und des Gipfelbereichs wurden jeweils vereinigt und mit Puffer F so verdünnt, daß 100 μ l davon im Gammazählgerät 20000 Impulse/Minute ergaben. Diese 3 Fraktionen des Tracers wurden in 9 ml-Portionen bei - 40° C gelagert.

Alternativ verwendeten wir zur Nachreinigung zuletzt die Affinitätschromatographie über Con A-Sepharose. Con A (Concanavalin A) ist ein Metalloprotein, das in Anwesenheit von Mn^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen spezifisch Zucker, Polysaccharide und damit auch Glykoproteine bindet.

1 ml Con A-Sepharose-Gel wurde in eine Glaspipette gegeben, deren Auslaß mit Glaswolle vorher locker verstopft worden war. Diese Säule (Durchmesser 0,5 cm) wurde mit 10 ml Puffer B äquilibriert.

Wir eluierten zuerst 10 Fraktionen à 1 ml mit Puffer B, die restliches $Na^{125}I$ und nicht an Con-A bindende Anteile des Tracers enthielten. Danach verwendeten wir Puffer G. Das darin enthaltene Methyl- α -D-Glucopyranosid verdrängt das Glykoprotein aus seiner Bindung an Con A.

Die so erhaltenen Tracerfraktionen wurden sofort nach ihrer Verdünnung (s.o.) auf ihre Bindungseigenschaften an die Antiseren geprüft und bei - 40° C tiefgefroren.

5.3. Spezifische Aktivität des Tracers

Die spezifische Aktivität einer radioaktiven Verbindung ist definiert als die Aktivität pro Gewichtseinheit einer Verbindung ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) (1 Curie = $3,7 \times 10^{10}$ Zerfälle/Sekunde). Sie wird aus verschiedenen, bei der Markierung gemessenen Zählraten berechnet (C/0,5 Min).

Rechenschema:

Zählrate in Protein = Eingesetzte Zählrate - Zählrate in der ^{125}I -Fraktion

$$\text{Jodierungsausbeute \%} = \frac{\text{Zählrate im Protein}}{\text{Eingesetzte Zählrate}} \times 100$$

In das Protein eingeführte Radioaktivitätsmenge

$$= \frac{\% \text{ Jodierungsausbeute}}{100} \times \text{Eingesetzte Akt. menge}$$

$$\text{Spez. Aktivität} = \frac{\text{Aktivität im Protein}}{\text{Einges. Gewicht des Proteins}}$$

Voraussetzung für diese Berechnung ist, daß alle Verluste an Radioaktivität durch Verluste des markierten Hormons bedingt sind, also keine Verluste an ^{125}I auftreten.

5.4. Immunreaktivität von ^{125}I -hCG und ^{125}I -hCG- β

Um die Affinität des Tracers zum Antikörper zu untersuchen prüften wir die maximale Bindung im Antikörperüberschuß. Die Titer der Antiseren ermittelten wir aus den Meßwerten einer linearen Antiserumverdünnungsreihe.

Der Titer ist definiert als 0,1 ml der Antiserumverdünnung, die der halbmaximalen Bindung an 0,1 ng Tracer entspricht.

Als Arbeitsverdünnung der Antiseren wählten wir die Konzentration, bei der 15 - 30 % der maximalen Bindung des Antiserums an den Tracer erreicht wurden.

Tab. 2: Titer und maximale Bindungsfähigkeit der verwendeten Antiseren an ^{125}I -hCG und ^{125}I -hCG- β

Antiserum	Titer	Maximale Bindung an den Tracer (%) ¹⁾	
		^{125}I -hCG ²⁾	^{125}I -hCG- β ²⁾
Anti-hCG- β SB 6 (NIAMDD)	1: 20000	69,8	84,7
Anti-hCG- β Serono	1: 15000	76,6	79,4
Anti-hCG- β RSL	1: 35000	69,2	82,3
Anti-hCG- β IRE AS 16	1: 1450	68,0	88,0
Anti-hCG IRE AS 15	1: 240000	62,4	17,1

1) Bindung B-N/Tx 100 (%) mit Antikörperüberschuß; B = gebundene Aktivität, N = unspezifische Bindung, T = Totalaktivität.

2) ^{125}I -hCG und ^{125}I -hCG- β wurden an Biogel P 6 und Con-A-Seph. gereinigt.

5.5. Stabilität des Tracers

Der Verwendungszeitraum des Tracers ist durch mehrere Faktoren begrenzt. Er ist im Allgemeinen kürzer als die Halbwertszeit des ^{125}I (= 60 Tage).

Die Stabilität wird hauptsächlich durch folgende Parameter beeinflusst: Radiolyse, Abspaltung von Jod, Aggregation markierter Proteine und allgemeiner Verlust an Immunreaktivität (Bolton 1979).

Radiolyse

Das als Fremdatom in das hCG-Molekül eingeführte ^{125}I führt sowohl zu Konformationsveränderungen als auch zu Radiolyse. Konformationsänderungen sind auch für "kaltes" eingeführtes Jod beschrieben (Merz 1983). Um diese Störeffekte so gering wie möglich zu halten, wurden die Markierungsbedingungen so gewählt, daß jedem hCG-Molekül nur ein Jod-Atom angelagert wurde.

Abspaltung von ^{125}I und Molekülaggregation

Der Anteil an freiem ^{125}I und Aggregaten wurde in Zeitabhängigkeit an einer Ultrogel AcA 44-Säule (1,5 x 90 cm) verfolgt.

Allgemeiner Verlust an Immunreaktivität

Die maximale Antikörperbindung (B_{max}) wurde für alle Tracerfraktionen (I, II und III) und für beide Markierungsmethoden (Chloramin T und Iodo GenTM) in regelmäßigen Zeitabständen überprüft.

5.6. Durchführung der Radioimmunoassays

Zur Durchführung klinischer Routinebestimmungen schien uns das Antiserum Anti-hCG- β der Firma Serono am besten geeignet. (Begründung siehe Ergebnisse + Diskussion.) Wir verwendeten es in der Verdünnung 1:20000. Die anderen Antiseren wurden üblicherweise auf 15-35 % des Wertes verdünnt, bei dem die maximale Tracerbindung im Antikörperüberschuß erreicht wird. Als Standard diente zunächst die 2nd International Reference Preparation (IRP) der WHO. Entsprechend einer Obereinkunft der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie wird neuerdings ein reineres Präparat, die 1st International Reference Preparation (IRP) (75/537) als Standard verwendet.

Die Kreuzreaktionen wurden mit hochgereinigten Hormonpräparaten untersucht (s. Materialien). Die RIA wurden nach dem aus Tabelle 3 ersichtlichen Arbeitsschema ausgeführt.

Wir verwendeten Polystyrol-Röhrchen die nach dem Zentrifugieren und Dekantieren mit gefaltetem Saugpapier trockengewischt wurden, um zu gewährleisten, daß nur die Aktivität des Präzipitats gemessen wird. Die verschlossenen Reaktionsgefäße wurden 2 Minuten im Gamma-Counter (Autogamma Berthold) gezählt.

Tab. 3: Pipettierschema zur radioimmunologischen hCG-Bestimmung, Mengen in μl

	T	N	Bo	Standard	B
	6 x	3 x	6 x	3 x	2 x
Puffer F		300	200	100	100
Antiserum, z.B. Anti-hCG- β Serono			100	100	100
Standard 2 nd I.S. -hCG				100	
Pat. Serum					100
Vorinkubation 48 h, 22 ^o C					
¹²⁵ I-hCG (¹²⁵ I-hCG- β)					
+ Kaninchenserum	100	100	100	100	100
1:300 (Tracer)					
Inkubation 24 h, 22 ^o C					
Anti-Kaninchen-gamma-globulin-Antiserum		100	100	100	100
1:40 in Puffer E					
(2. Ak)					
Inkubation 4 h, 22 ^o C					
Zentrifugation 2000 g, 20 min; dekantieren, Röhrchen mit Saugpapier trocken wischen; Probenzählung; Auswertung.					

T = Totale Aktivität (10 μl Tracer); N = Unspezifische Bindung (Tracer/2. Ak); Bo = Spezifische Bindung (Antikörper/Tracer); B = Probenwert (Antikörper/Tracer/in der Probe enthaltenes, unmarkiertes Antigen).

5.7. Auswertung der Assays

Rechnerische Auswertung

Ansätze mit Patientenseren wurden über ein Computerprogramm ausgewertet, das sich der Spline Funktion-Methode bedient (Huber et al. 1979, Marschner et al. 1974). Die Berechnung der Kreuzreaktionskurven erfolgte mittels Tischrechner.

Die Formeln zur Berechnung der Bindung lauten:

$$\text{Spezifische Bindung } B_0 \text{ in \% von T} = \frac{B_0 - N}{T - N} \times 100$$

$$\text{Unspezifische Bindung N in \% von T} = \frac{N}{T} \times 100$$

$$\begin{aligned} \text{Bindung an den Kurvenpunkten B} \\ \text{in \% von } B_0 &= \frac{B - N}{B_0 - N} \times 100 \end{aligned}$$

Zur Berechnung wurden jeweils die Mittelwerte der einzelnen Zählwerte herangezogen.

5.8. Spezifität

Die Spezifität der verwendeten Antiseren wurde mit möglichst reinen Präparationen der anderen Glykoprotein-hormone überprüft.

Sie wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Kreuzreaktion C (\%)} = \frac{A_{50}}{X_{50}} \times 100$$

wobei

A_{50} = die Menge an unmarkiertem Antigen (Standard), die 50 % des Tracers aus der Bindung an den Antikörper verdrängen kann

und

X_{50} = die Menge an kreuzreagierender Substanz X, die ebenfalls 50 % des Tracers aus der Antikörperbindung verdrängen kann.

Die linearen Verdünnungsreihen der kreuzreagierenden Substanzen wurden mit Puffer F in dem Bereich zwischen 20 Picogramm und 400 Nanogramm/ml erstellt, in logit/log-Transformation aufgetragen und ihre Steigung auf Parallelität mit der hCG- (oder hCG-B) Standardkurve untersucht.

5.9. Qualitätskontrollen

Richtigkeit

Die Richtigkeit der Assays wurde durch Wiederfinde- und Parallelitätstests untersucht (Hunter 1973, Rodbard 1974).

Beim Wiederfindetest wird durch Zugabe bekannter Mengen an Standard zu einer mehrfach bestimmten Probe die Re-

gressionslinie $y = ax + b$ dargestellt, indem man die theoretischen, errechneten Werte in einem Diagramm gegen die gemessenen Werte aufträgt. Im Idealfall, d.h. bei völliger immunologischer Identität der beiden Antigene hat die Gerade die Steigung eins.

Im Parallelitätstest werden die Steigungen der linearen Verdrängungskurven von 2nd I.R.P. -hCG und Serumproben mit hohem hCG-Gehalt miteinander verglichen. Nur bei annähernd gleicher Immunogenität des Antigens verlaufen die beiden Kurven parallel.

Präzision

Die Präzisionskontrolle dient zur Erfassung aller Zufallsfehler (unsystematischen Fehler) einer Methode. Zahlenmäßig wird die Präzision als Variationskoeffizient bei Mehrfachbestimmungen einer Probe angegeben. Wird die Streuung durch Mehrfachbestimmung einer Probe im gleichen Ansatz ermittelt, so spricht man vom Intraassayvariationskoeffizienten; die Streuung der Mehrfachbestimmungen gleicher Serumproben (Kontrollseren) verschiedener Ansätze bezeichnet man als Interassayvariationskoeffizient.

Die Variationskoeffizienten wurden nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Interassay-Vk} = \frac{\text{Gemittelttes S aller Werte}}{\text{Gesamt } \bar{x}} \times 100 (\%)$$

$$\text{Intraassay-Vk} = \sqrt{\frac{S_1^2 + \dots + S_n^2}{\text{Zahl der Assays} \times \text{Vielfachheit}}} \times 100 (\%)$$

S = Standardabweichung, $\bar{x}$ = Mittelwerte

5.10. Graphische Auswertung

Die Meßergebnisse linearer Verdünnungsreihen wurden entweder linear-logarithmisch oder, zur Ermittlung von Kreuzreaktionen (Parallelität, Steigung = Slope), logit-logarithmisch aufgetragen. Die Punkte der Standardkurven ergaben sich aus der jeweiligen Verdünnung des Antigens und der zugehörigen gemessenen Aktivität in % der maximal gebundenen Aktivität $\left(\frac{B - N}{B_0 - N} \times 100 \right)$.

Umgekehrt konnte aus der gemessenen Aktivität unbekannter Proben der zugehörige Antigengehalt abgelesen werden.

5.11. Berechnung der physiologischen Halbwertszeit von hCG

Die Abklingzeit von hCG wurde bei 10 Schwangeren post partum durch mehrfache Bestimmungen über einen Zeitraum von 120 Stunden bestimmt. Die logarithmische Auftragung der hCG-Spiegels zeigte eine annähernd linearen Abfall post partum. Die Halbwertszeit wurde mit der von Kohn (1979) beschriebenen Formel errechnet.

5.12. Bindungsverhalten von hCG an Con A-Sepharose

Um das Bindungsverhalten verschiedener Tumorseren und Seren Schwangerer an Con-A zu prüfen, chromatographierten wir diese an der oben beschriebene Säule und setzten den gebundenen und den nicht gebundenen Anteil in Relation zur aus dem RIA bekannten eingesetzten Gesamtmenge.

Zur Auswertung dieser Säulenläufe wurden die einzelnen

Fraktionen entweder in den entsprechenden RIA-Systemen oder, bei der Chromatographie von Tracer, direkt im Gammascint gemessen.

Die graphische Auftragung erfolgte in % der eingesetzten Gesamtmenge zur Anzahl der gesammelten Fraktionen.

6. ERGEBNISSE

6.1. Radioaktive Markierung von hCG

Die Markierung von hCG erfolgte durch zwei verschiedene Methoden: Chloramin T und Iodo-GenTM. Der dabei erreichte Jodierungsgrad zeigte keine wesentlichen Unterschiede. Die spezifische Aktivität betrug nach Markierung mit der Chloramin-T-Methode 78 uCi/ug (40,4 - 143,5 uCi/ug, N = 17), mit der Iodo-GenTM-Methode 78 uCi/ug (70-87 uCi/ug, N = 3). Der Jodierungsgrad entsprach damit im Mittel einem Jodatom/hCG-Molekül. Die Konzentration an ¹²⁵I-hCG betrug bei beiden Methoden 0,13 ng/l (0,05 - 0,22 ng/l).

Die Trennung von markiertem Hormon und freiem Na ¹²⁵I erfolgte durch Gel-Chromatographie an Biogel P 6 oder, bei der Iodo-GenTM-Markierung, durch Ionenaustauschchromatographie über Sephadex SP - C 25. Beide Methoden führten zu einer vollständigen Trennung von Hormon und Salz (Abb. 2 + 3).

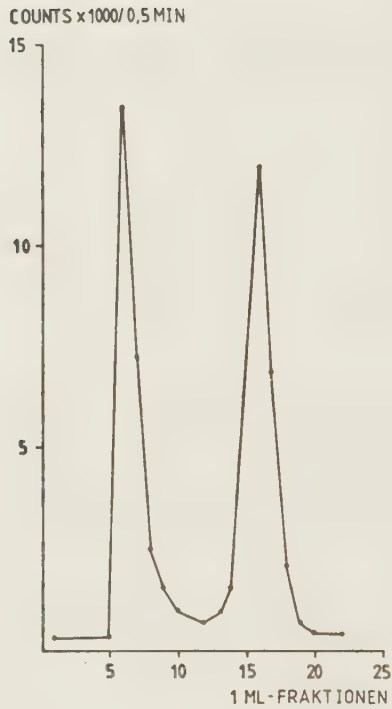


Abb. 2: Gelchromatographie von ^{125}I -hCG an Biogel P 6.
Fraktion 5 - 10 Hormongipfel, 14 - 20 Salzgipfel.

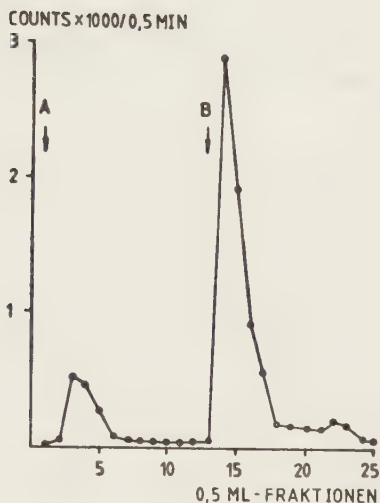


Abb. 3: Trennung von ^{125}I -hCG und $\text{Na } ^{125}\text{I}$ durch Ionenaustauschchromatographie an Sephadex SP-C-25. Fraktion 2-6 Salzgipfel, Elution mit Glycinpuffer pH 3 (A), Fraktion 13-17 Hormongipfel, Elution mit Phosphatpuffer pH 7,5 (B).

Die weitere Reinigung des Tracers erfolgte affinitätschromatographisch an Con A-Sepharose oder gelchromatographisch an Biogel P 60. Durch die Con A-Rechromatographie konnte die Bindung des Tracers an Anti-hCG-B Serono von 57,7 % auf 76,6 % erhöht werden (Con A Spitzenfraktion). (Abb. 4) Die Rechromatographie des frisch entsalzten hCG-Tracers über Biogel P 60 verbesserte die maximale Bindungsfähigkeit der Gipfelfraktion und der Fraktion des

absteigenden Schenkels an das Antiserum Anti-hCG-B Serono von 57,7 % auf 70,7 % (Mann et al. 1980 a) (Abb. 5). Durch nochmalige Con A-Chromatographie des Biogel P 60 nachgereinigten Tracers konnte dann die Antikörperbindung der Con A-bindenden Fraktion nochmals um 11 % gesteigert werden (Tab. 4).

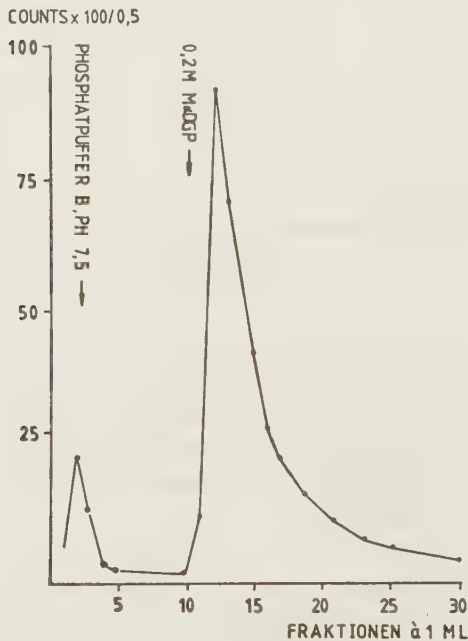


Abb. 4: Affinitätschromatographie von ^{125}I -hCG an Con A-Sepharose. (Biogel P60, Fraktion II.)
 Me-D-GP = Methyl-alpha-D-Glucopyranosid. Elution der nicht-Con A-bindenden Fraktion mit Puffer B, der Con A-bindenden Fraktion mit Puffer G.

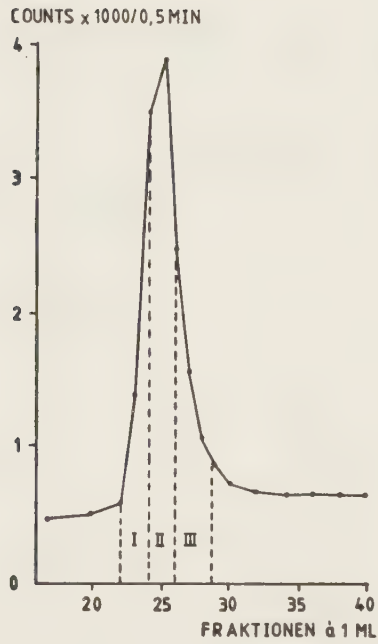


Abb. 5: Rechromatographie der Biogel P-6 Gipfelfraktion von ^{125}I -hCG an Biogel P 60.

Tab. 4: Vergleich der spez. Bindung von ^{125}I -hCG (CR 115) an Anti-hCG- β Serono nach Gelchromatographie des Tracers an Biogel P 6, Biogel P 6 und P 60, Biogel P 6 und Affinitätschromatographie über Con A-Sephrose und Biogel P 6, P 60 und Con A-Sephrose.

Chromatographie	Tracerfraktion	Bindung Bo	
		1:2050 ¹⁾	1:20000 ¹⁾
P 6	Spitzenfraktion	57,7	26,1
P 6 + P 60	I	46,2	20,3
	II	70,2	29,2
	III	70,7	19,9
P 6 + Con A	I	70,7	29,2
	II	72,0	34,3
	III	76,6	32,0
P 6 + P 60			
+ Con A	I	67,2	29,1
	II	83,3	28,6
	III	72,3	29,6
Con A (alleine)	I	65,7	14,7
	II	71,8	22,7

$$\text{Bo} = \text{B-N} / \text{T} \times 100 (\%)$$

1) Antiserumverdünnung

Die Con A-Chromatographie trennte Hormonanteile bzw. durch die Markierung entstandene Degradierungsprodukte mit niedriger spezifischer Antikörperbindung vom hCG ab. Unmarkiertes hCG CR 115 band vollständig an Con A. Die Con A-Bindung von hCG- β war geringer als die von hCG. Der

nicht-Con A-bindende Anteil von hCG- β (CR 115- β) betrug 7,5 %, von ^{125}I -hCG- β 28 % der aufgetragenen Menge.

Bei der nicht-Con A-bindenden Tracerfraktion handelte es sich nicht um restliches Na^{125}I . (Abb. 6)

Gelchromatographisch (AcA 44-Säule, 1,5 x 90 cm) konnte gezeigt werden, daß frischer Tracer fast Na^{125}I - frei war und daß 37 Tage nach der Markierung der Jodanteil erst 17 % der Gesamtaktivität betrug (Abb. 7).

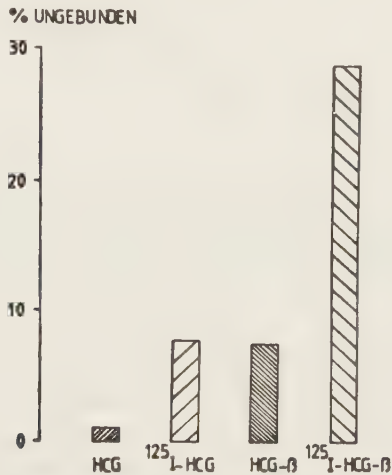


Abb. 6: Prozentualer Anteil der nicht an Con A-bindenden Fraktionen von hCG, ^{125}I -hCG, hCG- β und ^{125}I -hCG- β .

(Chloramin-T-Methode, Chromatographie Biogel P6 und P60)

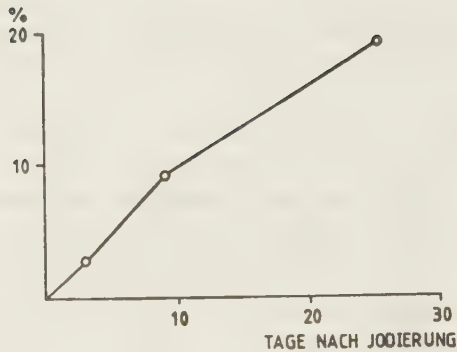


Abb. 7: Prozentualer Anteil der Aktivität von Na ^{125}I an ^{125}I -hCG nach radioaktiver Markierung in Abhängigkeit von der Zeit.
(Bestimmung durch Gelfiltration an AcA 44)

Die Stabilität des Tracers war nach der Markierung mit Iodo GenTM oder Chloramin T gleich. Abb. 8 zeigt den Bindungsverlust im Verlauf der Zeit nach Reinigung der beiden Tracer an Biogel P 60 gleich. Der Bindungsverlust zeigte für den aufsteigenden Schenkel, die Gipfel fraktion und den absteigenden Schenkel der Gelfiltration fast keine Unterschiede. (Abb. 9)

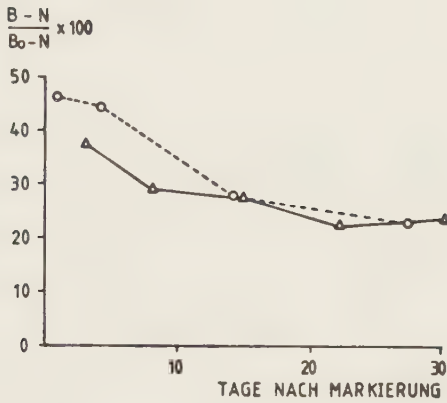


Abb. 8: Vergleich der Abnahme der spezifischen Bindung von ^{125}I -hCG an Anti-hCG- β Serono in Abhängigkeit von der Zeit.

Markierungsmethode: o-----o Iodo GenTM

Δ—Δ Chloramin T

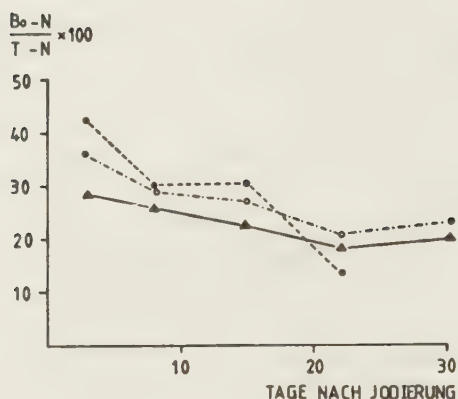


Abb. 9: Vergleich der Abnahme der spezifischen Bindung der Tracerfraktionen I, II und III von ^{125}I -hCG nach Biogel P 60 an Anti-hCG- β Serono in Abhängigkeit von der Zeit.

- Fraktion II
- o---o Fraktion III
- ▲---▲ Fraktion I

Eine Rechromatographie von ^{125}I -hCG an Con A-Sepharose 4 Wochen nach der Markierung führte zu einer Erhöhung der Bindung an Anti-hCG- β Serono (Verd. 1:20000) von 17 auf 24 % und der Tracer konnte weitere 20 Tage verwendet werden. Die Standardkurven mit 2^{nd} IRP oder hCG CR 115 unterschieden sich bei Verwendung von rechromatographiertem Tracer nicht.

Aufgrund dieser Ergebnisse stellten wir den hCG-Tracer folgendermaßen her:

Markierungsmethode: Chloramin T (alternativ Iodo GenTM)

Trennung Salz / Hormon: Gelchromatographie Biogel P 6.

Reinigung: Affinitätschromatographie der P 6-Spitzenfraktion über Con A-Sepharose.

Vereinigung der Con A-bindenden Fraktionen und Verdünnung (20 000 CPM/100 µl). Ein Teil des Tracers wurde unverdünnt bei - 40° C gelagert und im Bedarfsfall über Con A nach etwa einem Monat rechromatographiert. Auf diese Weise war der Tracer ca. 50 Tage verwendbar.

6.2. Herstellung des hCG-β-Tracers (CR 115-β)

Die Markierung von hCG-β erfolgte analog der von hCG. Die durchschnittliche spezifische Aktivität des β-Tracers lag bei 68 uCi/ug (31-143, N = 16), wenn mit der Chloramin T-Methode markiert wurde und bei 81 uCi/ug (62-167, N = 3) bei Iodo GenTM-Markierungen.

Wie bei der Markierung von hCG bedienten wir uns zur Trennung von ¹²⁵I-hCG-β und freiem Na ¹²⁵I der Gelchromatographie über Biogel P 6 oder Ionenaustauschchromatographie über Sephadex SP-C 25.

Die spezifischen Bindungen des hCG-β Tracers an die Antiseren Anti-hCG-β Serono und Anti-hCG-β AS 16 IRE zeigten keine wesentlichen Unterschiede. Wie bei der Herstellung des hCG-Tracers brachte die Rechromatographie über Con A-Sepharose einen zusätzlichen Anstieg der maximalen Tracerbindung an den Antikörper. (Tab. 5 + 6)

Wie Abb. 6 zeigt war jedoch der nicht an Con A bindende Anteil des über Biogel P6 vorgereinigten Tracers mit ca. 28 % auffallend hoch. Dies spricht für eine starke strukturelle Veränderung des Antigens, zumal die maximale Antikörperbindung dieser Fraktionen mit 25,5 % wesentlich geringer ist als die des Con A gebundenen Anteils (80,5 %).

Die ^{125}I -Abspaltung von ^{125}I -hCG- β betrug nach 30 Tagen 10-12 % (bestimmt durch Gelfiltration: Ultrogel AcA 44, 1,5 x 90 cm). (Abb. 10)

Die spezifische Bindung von Con A- oder Biogel P60-nachgereinigtem ^{125}I -hCG- β an Anti-hCG- β AS 16 IRE (Verdünnung 1:3000) zeigte 30 Tage nach der Markierung nur eine geringe Abnahme von 1-2 %. Im Antikörperüberschuß mit Anti-hCG- β Serono nahm die maximale Bindung nach 30 Tagen um ca. 7 % ab. (Abb. 11) Dabei zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den 3 verschiedenen Tracerfraktionen. (Abb. 12)

Tab. 5: Vergleich der spezifischen Bindung von ^{125}I -hCG- β (CR 115) an Anti-hCG- β Serono nach Gelchromatographie des Tracers an Biogel P 6, P 6 und P 60, P 6 und Con A-Sepharose, P 6, P 60 und Con A-Sepharose und Con A-Sepharose alleine.

Chromatographie	Tracerfraktion	Bindung Bo	
		1:2050 ¹⁾	1:20000 ¹⁾
P 6	Spitzenfraktion	76,3	35,0
P 6 + P 60	I	83,7	35,0
	II	86,2	38,6
P 6 + Con A	nicht gebunden	28,5	15,9
	gebunden II	83,4	41,3
	III	85,3	89,9
P 6 + P 60 Frakt. I + Con A (gesamt)	nicht gebunden	84,7	46,4
	gebunden	82,1	48,8
" II	nicht gebunden	90,3	50,6
	gebunden	88,6	50,2
" III	nicht gebunden	83,4	48,6
	gebunden	89,3	49,0
Con A alleine	nicht gebunden	9,7	6,6
	gebunden I	80,2	38,6
	II	83,8	37,8
	III	83,1	40,8

Bo = $B-T/T \times 100$ (%)

1) Antiserumverdünnung

Tab. 6: Vergleich der spezifischen Bindung von ^{125}I -hCG-B (CR 115) an Anti-hCG-B IRE AS 16 nach Chromatographie des Tracers an Biogel P 6, P 6 und P 60, P 6 und Con A-Sepharose, P 6, P 60 und Con A-Sepharose und Con A-Sepharose alleine.

Chromatographie	Tracerfraktion	Bindung Bo	
		1:1450 ¹⁾	1:3000 ¹⁾
P 6	Spitzenfraktion	73,4	29,7
P 6 + P 60	I	83,7	32,6
	II	82,7	32,8
	III	81,7	34,2
P 6 + Con A	nicht gebunden	25,5	13,1
	gebunden II	77,6	35,3
	III	80,5	37,0
P 6 + P 60 Frakt. I	nicht gebunden	78,7	37,4
	gebunden	84,5	40,4
" II	nicht gebunden	87,3	43,0
	gebunden	84,7	41,0
" III	nicht gebunden	79,2	39,9
	gebunden	86,9	41,9
Con A alleine	nicht gebunden	8,7	4,9
	gebunden I	76,8	31,9
	II	79,5	31,5
	III	79,7	30,8

Bo = $B-T/T \times 100 (\%)$

1) Antiserumverdünnung

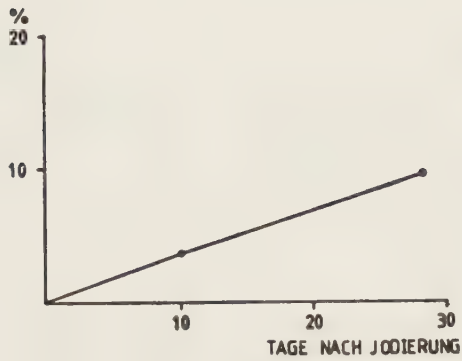


Abb. 10: ^{125}I -Abspaltung von ^{125}I -hCG- β in Abhängigkeit von der Zeit.

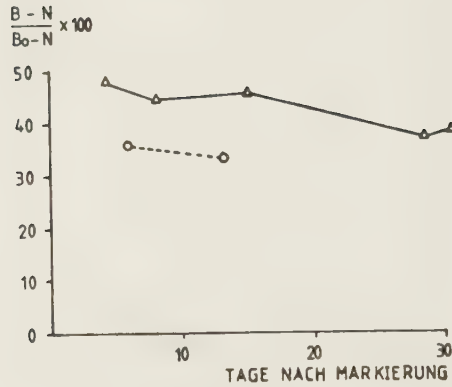


Abb. 11: Vergleich der Abnahme der Spezifischen Bindung von ^{125}I -hCG- β an Anti-hCG- β Serono in Abhängigkeit von der Zeit.

o-----o Iodo Gen TM

Δ—Δ Chloramin T

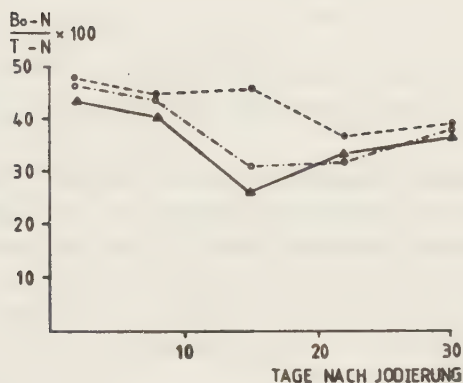


Abb. 12: Vergleich der Abnahme der spezifischen Bindung der Tracerfraktionen I, II und III von ^{125}I -hCG- β nach Biogel P 60 an Anti-hCG- β Serono in Abhängigkeit von der Zeit.

- - - - ● Fraktion II
- - - - ○ Fraktion III
- ▲- - - - ▲ Fraktion I

Die vorliegenden Untersuchungen erbrachten bei der Markierung von hCG und hCG- β und der nachfolgenden chromatographischen Reinigung der radioaktiven Antigene ähnliche Ergebnisse. Die Herstellung des hCG- β Tracers erfolgte deshalb auf die gleiche Weise wie bei hCG.

6.3. Titer der untersuchten Antiseren

Anti-hCG- β C-23333-3D (Serono)

Die maximale Bindung dieses Antiserums mit ^{125}I -hCG (CR 115) lag im Antikörperüberschuß bei 69,8 % (s. Tab. 1).

Wie vom Hersteller angegeben lag der Titer des Antiserums bei einer Endverdünnung von 1:20 000 (B/T = 35 %). Wir verwendeten dieses Antiserum im RIA in einer Endverdünnung von 1:60 000.

Anti-hCG-IRE (AS 15)

Die Titerkurven dieses Antiserums mit ^{125}I -hCG und ^{125}I -hCG- β zeigten wie erwartet eine deutlich höhere Bindung an ^{125}I -hCG. Im Antikörperüberschuß band ^{125}I -hCG zu 62,4 % und ^{125}I -hCG- β nur zu 17,1 %. Die halbmaximale Bindung (Titer) des Antiserums an ^{125}I -hCG erfolgte bei einer Verdünnung des Antiserums von 1:240 000.

Anti-hCG- β IRE (AS 16)

Der Titer dieses Antiserums lag mit 1:1450 für ^{125}I -hCG- β relativ niedrig. Wir verwendeten es in einer Arbeitsverdünnung von 1:3000. Die maximale Bindung an ^{125}I -hCG- β (Biogel P 60 - gereinigt) war 88 %, an ^{125}I -hCG 68 %.

Anti-hCG- β SB 6 (NIAMDD)

Im Antikörperüberschuß zeigte das Antiserum eine maximale Bindung von 84,7 % an ^{125}I -hCG- β und 69,8 % an ^{125}I -hCG. Der Titer des Antiserums lag bei 1:20 000.

Wir verwendeten alle Antiseren üblicherweise in einer Verdünnung, die 15 - 35 % des Tracers im Nullstandard band.

6.4. Inkubationszeit der Assays

Durch sog. "kalte" Vorinkubation (nach Felber 1974), d.h. Inkubation der Hormonstandards bzw. der Probe mit dem 1. Antikörper über 48 Stunden und erst anschließender Inkubation mit dem Tracer wurde die Sensitivität von durchschnittlich $3,6 \pm 1,8$ IU/l ($N = 5$) auf $1,4 \pm 1,2$ IU/l ($N = 100$) ($\bar{x} \pm SD$) verbessert.

Abb. 13 zeigt die Abhängigkeit der spezifischen Bindung von ^{125}I -hCG an Anti-hCG- β Serono von der Inkubationszeit (22°C) zwischen Tracer- und Doppelantikörperzugabe. Das Reaktionsgleichgewicht war nach 24 Stunden erreicht.

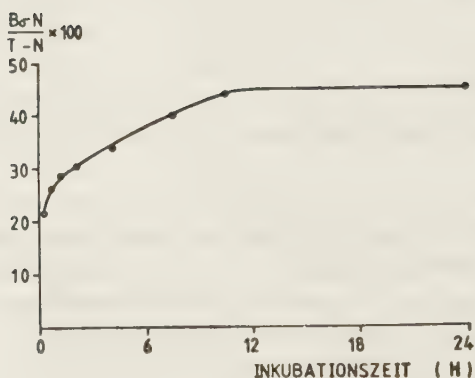


Abb. 13: Anti-hCG-β Serono. Abhängigkeit der spezifischen Bindung von der Inkubationszeit zwischen Tracer- und Doppelantikörperzugabe (2. Antikörper). Tracer ^{125}I -hCG-β.

6.5. Spezifität der Antiseren

Die Spezifität der Antiseren Anti-hCG-β SB 6, Anti-hCG-β Serono, Anti-hCG AS 15 IRE, Anti-hCG-β AS 16 IRE und Anti-hCG-β RSL wurde mit Hilfe der in Tab. 7 aufgeführten Glykoproteinhormone und Hormonuntereinheiten untersucht.

Bei dem Antiserum Anti-hCG-β SB 6 war das Ausmaß der Kreuzreaktion von der Art des Tracers abhängig. Bei Verwendung von ^{125}I -hCG-β als Tracer ergab sich eine nur minimale Kreuzreaktion mit LH (0,4 %). Im heterologen System mit ^{125}I -hCG als Tracer zeigte sich mit 5,5 % eine

noch relativ hohe LH-Kreuzreaktion. Mit einer hCG-Kreuzreaktion von 34 % im heterologen und 9 % im homologen System ist der Antikörper Anti-hCG- β SB 6 für die spezifische Bestimmung von hCG- β ungeeignet. Nur im homologen System können hCG und hCG- β in Gegenwart von LH spezifisch erfaßt werden. Dabei sind Rückschlüsse auf den hCG oder hCG- β Anteil über die Kreuzreaktion von hCG nicht möglich, da die Standardverdrängungskurven beider Substanzen weder im heterologen noch im homologen System parallel verlaufen (Abb. 14).

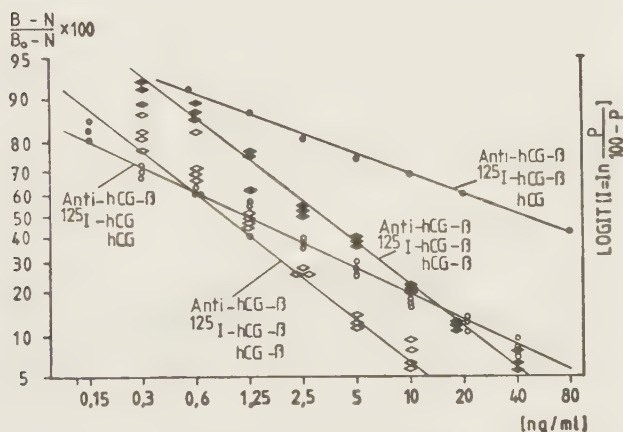


Abb. 14: Charakterisierung von Anti-hCG- β SB 6 (NIAMDD): hCG- und hCG- β -Standardkurven im heterologen System (^{125}I -hCG/Anti-hCG- β SB 6) und im homologen System (^{125}I -hCG- β /Anti-hCG- β SB 6).

Tab. 7: Kreuzreaktionen der Glykoproteinhormone und Untereinheiten

Tracer	Antiserum	Standard	Kreuzreaktion in % ¹⁾				
			LH	FSH	TSH	hCG	hCG- β LH- β
125 I-hCG	Anti- β SB 6	hCG	5,5	0,3	0,2	100	81,6
125 I-hCG	Anti- β SB 6	hCG- β	4,0	0,3	0,1	34	100
125 I-hCG- β	Anti- β SB 6	hCG- β	0,4	0,08	0,06	9	100
125 I-hCG	Anti- β Serono	hCG	0,25	0,07	0,02	100	148
125 I-hCG	Anti- β Serono	hCG- β	0,07	0,02	0,01	28,6	100
125 I-hCG- β	Anti- β Serono	hCG- β	0,07	0,03	0,01	59	100
125 I-hCG	Anti- β RSL	hCG	0,3	0,06	0,04	100	312
125 I-hCG- β	Anti- β RSL	hCG- β	0,08	0,03	0,01	32	100
125 I-hCG	Anti-hCG IRE	hCG	2,4	0,07	0,01	100	0,06
125 I-hCG- β	Anti-hCG β IRE	hCG- β	0,01	0,01	0,01	2,2	100
							0,01

1) Kreuzreaktion definiert als die Hormonmenge, die 50 % des gebundenen Tracers vom Antikörper, verdrängt. (N = 3-5)

Auch die Kreuzreaktion der anderen hCG- β Antiseren war gering. Die Kreuzreaktion mit LH lag zwischen 0,01 und 0,3 %.

Standardverdrängungskurven der Reinpräparationen hCG-CR 115, hCG- β CR 115- β und des 2nd IRP-hCG waren bei logit-log Transformation nur parallel wenn Anti-hCG- β Serono als Antiserum und ¹²⁵I-hCG als Tracer verwendet wurden. Somit weist dieses Antiserum gleiche Affinität für alle drei hCG-Präparationen auf (Abb. 15).

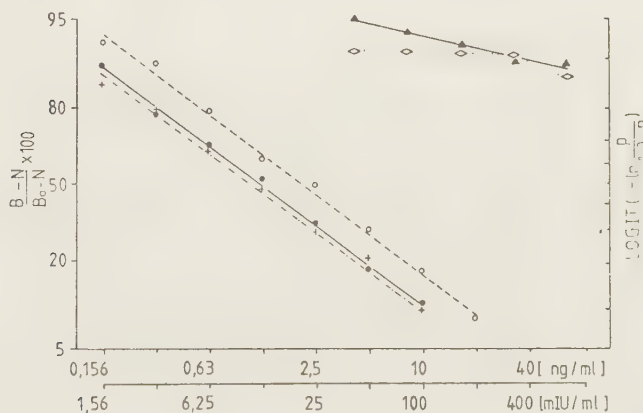


Abb. 15: Charakterisierung von Anti-hCG- β Serono: Standardkurven im heterologen System (¹²⁵I-hCG/Anti-hCG- β Serono) von hCG, hCG- β und 2nd IRP-hCG und Kreuzreaktionen mit LH (LER 960) und FSH (HS 1). HCG (CR 115) o----o, hCG- β (CR 115 β) o—o, 2nd I.S.-hCG +---+, LH (LER 960) ▲—▲, FSH (HS 1) ◇.....◇

Das Antiserum Anti-hCG AS 15 IRE, das vom Hersteller mit LH absorbiert worden war, besitzt mit LH noch eine Kreuzreaktion von 2,4 %. Sie liegt damit um eine Zehnerpotenz höher als die der anderen kommerziellen Antiseren. Als einziges Antiserum weist jedoch Anti-hCG AS 15 nur eine sehr geringe Kreuzreaktion mit hCG- β auf, sodaß es für hCG als weitgehend spezifisch angesehen werden kann. Eine hohe spezifische Bindung konnte allerdings mit ^{125}I -hCG nur erreicht werden, wenn der Tracer mit der Lactoperoxidase-Methode (Bolton 1979) hergestellt wurde.

6.6. Qualitätskontrolle

Tumor- ($N = 3$) und Schwangerenserum ($N = 4$) wurden zu $93,6 \% \pm 5,2 \% (\bar{x} \pm \text{SD})$ wiedergefunden (Abb. 16).

Im Parallelitätstest ergab sich für 2nd IRP-hCG und die linearen Verdünnungskurven von Tumor und Schwangerenserum die gleichen Steigungen.

Die Präzision lag im üblicherweise für RIAs anerkannten Bereich. Der Intra- und der Interassayvariationskoeffizient geht aus Tab. 8 hervor.

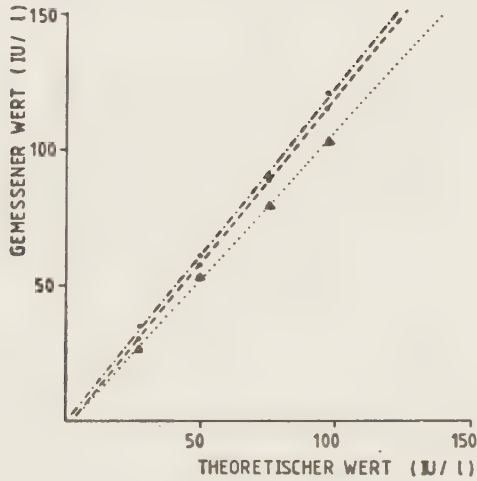


Abb. 16: Wiederfindekurven dreier Patientenserum im ^{125}I -hCG/Anti-hCG- β Serono/2nd IS.-RIA.

Schwangerenserum B.	-----
Tumorserum S.	-.-.-.-.-
Tumorserum P.	

Tab. 8: Intra- und Interassayvariationskoeffizienten des ^{125}I -hCG/Anti-hCG- β Serono-Radioimmunoassays, bestimmt an 5 (3) Poolseren verschiedener Konzentrationen.

Serumprobe	Zahl der Bestimmungen	Konzentration $\bar{x}$ (IU/l)	SD (IU/l)	VK (%)
Intraassayvariation				
I	8	2,7	0,3	12,4
II	7	5,9	4,0	6,7
III	8	13,4	0,6	4,5
IV	12	32,9	1,7	5,3
V	4	132,2	8,1	6,4
Interassayvariation				
I	27	6,2	1,6	25,5
II	14	29,4	3,8	12,9
III	14	123,5	12,2	9,8

6.7. Eigenschaften des hCG/hCG- β RIA

Der heterologe RIA ^{125}I -hCG/Anti-hCG- β Serono wurde aufgrund der beschriebenen Eigenschaften - hohe Spezifität und parallele Verdrängungskurven für hCG und 2^{nd} IRP-hCG - für Routinebestimmungen eingesetzt. Die wichtigsten Parameter sind in Tab. 9 zusammengefaßt.

Tab. 9: Spezifischer hCG/hCG- β Radioimmunoassay (N = 100)

Tracer:	^{125}I -hCG, spez. Akt. 78 uCi/ug ($\bar{x}$)
Antikörper:	Anti-hCG- β , Verd. 1:20000 (Serono)
Doppelantikörper:	Anti-Kaninchen-Gammaglobulin-Anti-serum 1:40
Standard:	2^{nd} I.S.-hCG
Untere Nachweisgrenze:	$1,4 \pm 1,2$ IU/l
Spezifische Bindung:	$25,5 \pm 6,4$ % ($\bar{x} \pm \text{SD}$)
Unspezifische Bindung:	$1,3 \pm 0,8$ %
50 % Intercept:	$13,3 \pm 4,5$ IU/l
Slope:	$- 0,902 \pm 0,28$

Untere Nachweisgrenze = Dreifache Standardabweichung des Bo-Wertes

50 % Intercept = Diejenige Hormonmenge, die 50 % des Tracers aus der Antikörperbindung verdrängt

Slope = Steigung der Geraden, die sich durch logit/log - Transformation der Meßpunkte einer lin / log aufgetragenen Sigmakurve ergibt, also die Steigung der Standardverdrängungskurve.

6.8. Radioimmunoassay zur Bestimmung der hCG- β Untereinheit

Das Antiserum Anti-hCG- β AS 16 IRE ist zur spezifischen Bestimmung der monomeren hCG- β Untereinheit geeignet. Die spezifische Bestimmung der β -Kette besitzt aber nur untergeordnete klinische Relevanz und bleibt daher speziellen Fragestellungen in der Forschung vorbehalten. Das An-

tiserum wurde im homologen System ^{125}I -hCG- β /Anti-hCG- β AS 16 IRE/hCG- β (CR 115- β)-Standard angewendet. Die Kenn-
daten dieses Ria's zeigt Tab. 10.

Qualitätskontrolle

Die Wiederfindung von hCG- β betrug $91,2 \pm 7,3 \%$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$).
Serienverdünnungen von Tumor- und Schwangerenserum ver-
liefen mit der hCG- β Standardkurve parallel.

Die Präzision des Ria's ist aus den Variationskoeffizien-
ten ersichtlich. (Tab. 11)

Tab. 10: Kenndaten des hCG- β -Rias ^{125}I -hCG- β /Anti-hCG- β AS 16 IRE
(N = 23)

	Spezifische Bindung (%)	Unspez. Bindung (%)	Untere Nachweisgrenze ($\mu\text{g/l}$)	50 % Intercept ($\mu\text{g/l}$)	Slope
$\bar{x}$	28,3	1,3	0,085	1,12	- 0,9337
$\pm$ SD	4,6	0,35	0,053	0,476	0,16
VK (%)	16,1	27,2	62,1	42,5	12,0

Tab. 11: Intra- und Interassayvariationskoeffizienten des hCG- β Ria's. (Mehrfachbestimmungen von drei Schwangerenseren mit verschiedenen hCG- β -Konzentrationen)

Serumprobe	Zahl der Bestimmungen	Konzentrationen $\bar{x}$ ($\mu\text{g/l}$)	SD ($\mu\text{g/l}$)	VK (%)
I	11	0,25	0,04	8,6
II	13	1,6	0,03	2,0
III	14	8,9	0,56	6,3

6.9. Normal- und Referenzbereich

Die Normal- und Referenzbereiche für hCG und hCG- β wurden von PD Dr. Mann (II. med. Klinik, Klinikum Großhadern) und Prof. Dr. Vogt (Klinische Chemie, Klinikum Großhadern) ermittelt.

Im ^{125}I -hCG/Anti-hCG- β Serono-RIA ergab sich bei 99 gesunden Bundeswehrsoldaten (Alter zwischen 17 und 25 Jahren, medianes Alter 20 Jahre) ein Normbereich für hCG zwischen 0,5 und 2,4 IU/L und für hCG- β zwischen 0,1 und 0,3 $\mu\text{g/L}$ (Tab. 12).

Zusätzlich wurden männliche und weibliche Referenzkollektive ohne tumoröse und chronisch entzündliche Erkrankungen, in Altersgruppen gegliedert, untersucht (Tab. 12).

Die Referenzbereiche lagen für hCG bei Männern unter 3 IU/l, bei Frauen unter 4 IU/l.

Tab. 12: HCG- und hCG- β -Serumspiegel bei gesunden Bundeswehrsoldaten und hCG-Serumspiegel bei Patienten ohne tumoröse oder chronisch-entzündliche Erkrankungen mit normaler Nierenfunktion.

	Alter	N	Minimum	Perzentile					Maximum	
				10 %	25 %	50 %	75 %	90 %		
Bundeswehrsoldaten										
hCG (IU/l)	17-25	99	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	2,4	
hCG-β (ug/l)	17-25	99	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,3	0,5	
Patienten (hCG)										
	31	32	0,5	0,5	0,5	0,5	1,2	1,5	1,9	
	31	45	0,5	0,5	0,5	0,5	1,5	1,8	2,8	
Patientinnen										
	50	45	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,8	3,8	
(hCG)	50	50	0,5	0,5	0,5	0,5	1,6	3,2	3,9	

6.10. Serumabklingraten von hCG bei Schwangeren post partum

Bei 10 Schwangeren wurde hCG in kurzen Zeitabständen nach der Entbindung bestimmt. Die daraus errechnete Abklingrate, in der die Hälfte des Ausgangswertes von hCG gemessen wurde, lag zwischen 10 und 34 Stunden. Die Abklingzeit wurde nach folgender Formel berechnet (Kohn 1979):

$$T_{1/2} = \frac{-0,693 \times T}{\frac{\log_e \text{Konz } T}{\text{Konz } 0}}$$

T = Zeit in Tagen
 Konz 0 = Anfangskonz.
 Konz T = Konz. zum Zeitpunkt T
 e = Natürl. Logarithmus

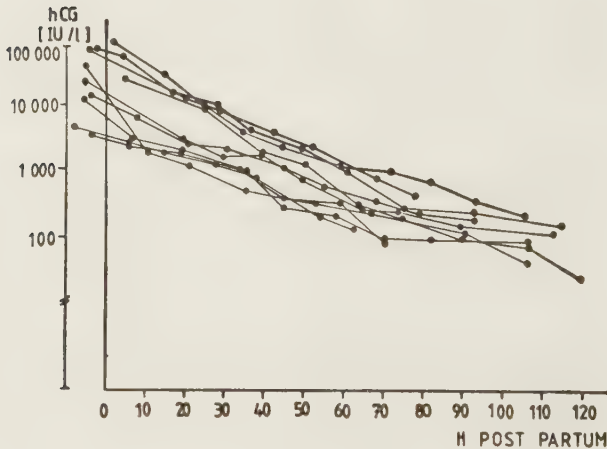


Abb. 17: Abklingkurven des hCG-Gehaltes aus Schwangeren-seren post partum (N = 10).

6.11. Affinitätschromatographie von Tumor- und Schwangerenserum sowie Fruchtwasser an Con A-Sepharose

In der Literatur finden sich Hinweise, daß aus Tumoren sezerniertes hCG einen geringeren Glykosilierungsgrad besitzt als in der Plazenta gebildetes (Braunstein et al. 1973 u. 1979, Yoshimoto et al. 1979 u. 1977). Die Affinitätschromatographie über das zuckerbindende Concanavalin A schien uns am geeignetsten zur weiteren Untersuchung einer möglicherweise bestehenden molekularen Heterogenität von hCG in Tumorseren.

Wir untersuchten deshalb 3 Seren von Patienten mit hCG-produzierenden Keimzelltumoren des Hodens auf ihre Bindungsfähigkeit an das Lectin Concanavalin A und verglichen sie mit der von Schwangerenserum (N = 4), Fruchtwässern (N = 8) (s. Tab. 13) und den Reinsubstanzen hCG CR 115 und hCG- β CR 115- β .

Das Bindungsverhalten der Reinsubstanzen und der Tracer (hCG und hCG- β) sind unter dem Punkt "Rechromatographie der markierten Substanzen" beschrieben (Abb. 6). Die Elutionsprofile der hCG-positiven Proben sind aus Abb. 18 und Abb. 19 ersichtlich. Dabei ist der nicht-Con A-bindende hCG-Anteil aus den Tumorseren wesentlich größer als bei den Fruchtwässern und den Schwangerenserum.

Er betrug bei den Tumorpatienten 26,8 %, 15,4 % und 21,8 %, im Schwangerenserum wurde 0,31 % nicht gebunden und bei den Fruchtwässern 4,48 % (32. - 37. SSW) und 6,63 % (13. - 15. SSW) (Tab. 13).

Zur Berechnung des nicht-Con A-bindenden Anteils wurden die Probenwerte der entsprechenden Fraktionen addiert und

in Relation zur eingesetzten Gesamtmenge gesetzt.

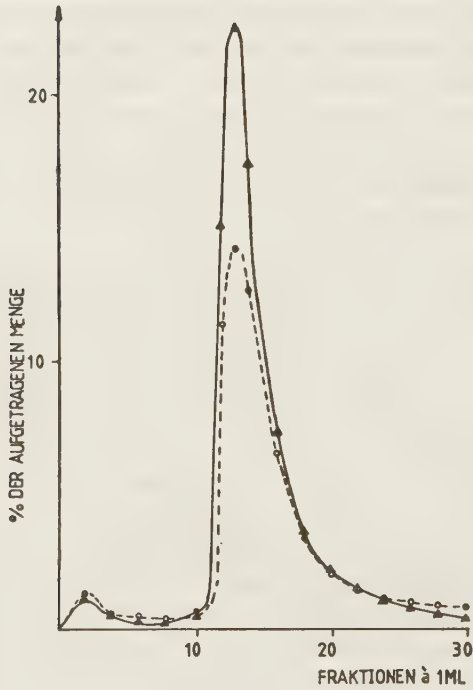


Abb. 18: Bindungsverhalten hCG-positiver Fruchtwässer an Con A-Sepharose.

32. - 37. SSW (N = 3): _____

13. - 15. SSW (N = 4): - - - - -

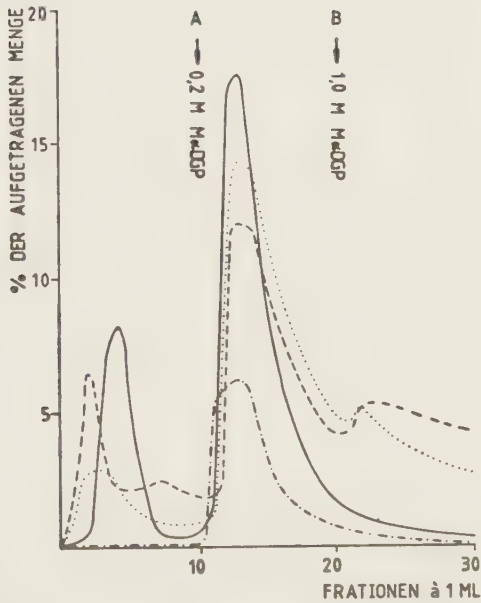


Abb. 19: Bindungsverhalten hCG-positiver Patientenseren an Con A-Sepharose. (A = Zugabe v. Puffer G, B = Zugabe v. Puffer H)

H. -----

U.

K. _____

B. -.-.-.-.-

Tab. 13: Bindungsverhalten von plazentarem hCG und Tumor-hCG an Concanavalin A-Sepharose

	nicht Con A- bindender Anteil (%)	Con A-bindender Anteil (%)	Recovery (%)
Tumorseren			
H.	26,8	121	148,3
U.	15,4	123	138,4
K.	21,8	67,7	89,4
Fruchtwasser ($\bar{x}$, N = 7)			96,3
13. - 15. Woche ($\bar{x}$, N = 4)	6,63		
32. - 37. Woche ($\bar{x}$, N = 3)	4,48		

7. DISKUSSION

7.1. Markierung

Für die Tracerherstellung verwendeten wir hochgereinigte Hormonpräparationen, die aus Schwangerenurin des ersten Trimenon isoliert wurden (van Hell 1968, Bell et al. 1969). Der Sammelurin solcher Patientinnen bietet sich bei einer Exkretion von 30 000 bis 50 000 IU hCG/24 h zur Hormonisolierung an. Der Harn Schwangerer enthält jedoch neben dem intakten Molekül auch dessen Untereinheiten, Bruchstücke und andere Verunreinigungen (z.B. Aggregationen). Da der Tracer und das zu bestimmende, unmarkierte Hormon aber immunologisch gleich reagieren sollen, müssen restliche Verunreinigungen und hCG-Verunreinigungen durch chromatographische Methoden vom intakten hCG-Molekül getrennt werden.

Ferner kann es durch die Markierungsreaktion zu Veränderungen der Sekundär- und der Tertiärstruktur und damit der für die Antigen-Antikörperreaktion wichtigen Bindungsstellen kommen. Besonders die Einführung von Jod als Fremdatom (radioaktiv oder nicht radioaktiv) kann zu solchen strukturellen Veränderungen führen (Merz et al. 1983). Dabei wird die Immunreaktivität erst dann signifikant vermindert, wenn mehr als ein Jodatome pro Hormonmolekül eingeführt wird (Merz et al. 1983). Diese unerwünschten Effekte sollen durch die Wahl einer möglichst schonenden Markierungsmethode vermieden werden.

Bei der am meisten benutzten Methode, der Chloramin T-Methode (Greenwood, Hunter und Glover 1963), wird das hCG-Molekül sowohl oxidierenden als auch reduzierenden Reagenzien ausgesetzt und kann dadurch im Bereich seiner An-

tigendeterminanten immunologisch verändert werden. Allerdings werden bei dieser Methode nur geringe Mengen an Reagenzien eingesetzt und die Reaktion verläuft innerhalb kurzer Zeit. In der Regel stellen deshalb die beschriebenen chemischen Angriffe nur selten ein Problem dar. Dies ist leicht nachzuweisen, indem man in einen Markierungsansatz alle Reagenzien außer Na (^{125}I) Jodid unter identischen Bedingungen einsetzt und anschließend die Immunreaktivität des eingesetzten Hormons prüft.

Als Alternative zu der sehr einfachen Chloramin T-Methode, die eine hohe Tracerausbeute ergibt, wurden weitere Markierungsmethoden empfohlen. Einige Autoren berichten über gute Ergebnisse bei der Anwendung von Lactoperoxidase (Miyachi et al. 1972, Thorell und Johansson 1972). Andere Arbeitsgruppen verwenden Chlor (Butt 1972) oder Natriumhypochlorid (Redshaw und Lynch 1974) anstelle von Chloramin T. Fraker et al. (1976), Wood et al. (1980) und Ferguson et al. (1979) bedienten sich der Iodo GenTM-Markierungsmethode. Ein von Wood et al. mit dieser Methode hergestellter LH-Tracer ergab eine sehr hohe Markierungsausbeute mit geringerer spezifischer Aktivität als bei der Chloramin T-Methode.

Unsere Untersuchungen ergaben eine geringere Markierungsausbeute bei der Iodo GenTM-Methode als bei der Chloramin T-Methode.

Die spezifische Aktivität, d.h. der Jodierungsgrad eines Tracers beeinflusst einerseits über die Anzahl der radioaktiven Impulse die Assayempfindlichkeit. Andererseits führen mehrere Jodatome an einem hCG-Molekül zu einer stärkeren Radiolyse, eine eingreifendere Markierungsreaktion zu einer vermehrten Konformationsänderung. Deshalb

stellt die spez. Traceraktivität immer einen Kompromiß dar. Als Richtlinie wurde ein Verhältnis von einem Jodatom pro hCG-Molekül empfohlen (Bolton et al. 1979). Die aus Atom- und Molekulargewicht errechnete spezifische Aktivität des hCG-Tracers beträgt dabei 76 uCi/ug.

7.2. Spezifität

Die spezifische Bestimmung von hCG erwies sich durch die besondere Strukturähnlichkeit mit LH, in geringerem Maß auch mit FSH und TSH, als problematisch. Erst mit der Entwicklung von hCG- β Antiseren konnte die Spezifität verbessert werden (Vaitukaitis et al. 1971, Kardana und Bagshawe 1976, Kawamura et al. 1978, Mann et al. 1980 b, Tyrey und Hammond 1975, Yoshimoto et al. 1977).

Das von Vaitukaitis et al. (1971) hergestellte hCG- β Antiserum SB 6 wird zur Zeit am häufigsten verwendet (Braunstein et al. 1975, Lähteenmäki 1978, Monteiro et al. 1983, Mann et al. 1980 b, Papapertou et al. 1980, Rutanen et Seppälä 1978, Saxena 1980, Schüssler et al. 1978, Seppälä et al. 1978, Seppälä 1976, Tyrey und Hammond 1976, Wehmann und Nisula 1980, Weintraub 1973, Yoshimoto et al. 1977). Die Ergebnisse einiger Autoren, die dieses Antiserum verwendeten ließen jedoch Zweifel an seiner Spezifität aufkommen. Monteiro et al. (1983) fanden bei 51 % von Patientinnen mit Ovarialkarzinom sowohl erhöhte hCG- als auch erhöhte LH-Werte mit SB 6 und führten diese Ergebnisse auf eine LH-Kreuzreaktion zurück. Papapertou et al. (1980) untersuchten 70 Patienten mit malignen Erkrankungen auf ihren hCG-Spiegel im Serum und im Urin mit SB 6 und fanden bei 17,1 % im Serum und bei 44,3 % im Urin erhöhte hCG-Werte. Bei 28,6 % der Patien-

ten waren nur die hCG-Spiegel im Urin erhöht. Bei diesen Untersuchungen wurde eine LH-Kreuzreaktion von 7 % im heterologen und von 1,1 % im homologen SB 6-System beschrieben, was ebenfalls auf eine noch nicht ausreichende Spezifität von SB 6 schließen läßt.

Ober ähnliche Ergebnisse berichten auch Rutanen u. Seppälä (1978). 380 Patientinnen mit nicht-trophoblastischen Erkrankungen wurden untersucht. Bei 18 % der Malignompatientinnen und 14 % der Patientinnen mit gutartigen Erkrankungen wurden erhöhte hCG-Spiegel gefunden. In der Gruppe der Patientinnen mit gutartigen Erkrankungen waren die hCG-Positiven signifikant älter als die hCG-Negativen und befanden sich z.T. bereits in der Menopause. Da bei diesen älteren Patientinnen LH physiologisch erhöht ist, kann dies bei nicht ausreichender Spezifität des verwendeten hCG-RIAs zu falsch-positiven hCG-Werten führen. Die Autoren überprüften die Spezifität des homologen SB 6 RIAs und fanden eine signifikant erhöhte Kreuzreaktion von 4 % mit dem Referenzpräparat LER 907 (enthält FSH und LH). Schüssler et al. (1978) verwendeten ebenfalls das homologe SB 6-System und fanden bei 102 gynäkologischen Ca-Patientinnen in 46 % der Fälle falsch-positive hCG-Werte. Die dabei angegebene untere Nachweisgrenze lag mit 1 IU/l sehr niedrig, sodaß bereits physiologische LH-Konzentrationen, wie sie z.B. in der Menopause vorkommen, zu falsch-positiven hCG-Werten führen können. Im Bereich unter 5 IU/l bestand eine Kreuzreaktion mit physiologisch vorkommenden LH von 1,6 %. Yoshimoto et al. (1977) fanden im homologen SB 6-System eine Kreuzreaktion mit LH (LER 960) von 10 %.

Im Gegensatz dazu berichten Kardana et al. (1976) und Saaman et al. (1976) über hCG- β SB 6-RIAs ohne LH-Kreuzre-

aktion.

Unsere eigenen Untersuchungen ergaben im heterologen System ^{125}I -hCG/Anti hCG- β SB 6 eine LH-Kreuzreaktion von 5,5 %. Bei Verwendung von ^{125}I -hCG- β als Tracer war die Kreuzreaktion mit LH dagegen minimal; die hCG-Kreuzreaktion mit hCG- β als Standardpräparat betrug 9 %. Neben der beträchtlichen LH-Kreuzreaktion im heterologen hCG/SB 6-RIA fiel auch eine unterschiedliche Affinität des Antikörpers zu hCG und hCG- β auf. Die Standardkurven von hCG und hCG- β verliefen weder im homologen noch im heterologen System parallel, sodaß bei der Bestimmung einer unbekannten Probe keine Aussage darüber gemacht werden kann, welches der beiden Hormone gemessen wird. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Papapertou et al. (1980).

Diese Ergebnisse zeigen, daß auch durch Immunisierung gegen die isolierte hCG- β Untereinheit noch keine voll zufriedenstellende Spezifität der Antiseren erreicht werden konnte. Einige Arbeitsgruppen versuchten deshalb die Spezifität weiter zu verbessern indem sie gegen das isolierte, für hCG hochspezifische C-terminale Peptid von hCG- β gerichtete Antiseren herstellten (Chen et al. 1976, Louvet et al. 1975, Matsuura et al. 1978). Dabei wurden entweder native oder syntetische Präparationen zur Immunisierung verwendet. Diese hochspezifischen Antiseren sind jedoch nicht allgemein verfügbar.

Reuter et al. (1976) arbeitete mit Antiseren, die durch Immunabsorption mit LH behandelt worden waren. Dabei sollen die für die LH-Kreuzreaktion verantwortlichen Antikörperanteile gebunden und damit eliminiert werden. Die Autoren geben für das auf diese Weise gewonnene hCG-Antiserum AS-hCG-57 (= AS 15 IRE) folgende Kreuzreaktionen im

homologen System an: HCG-alpha 0,03 %, hCG-B 0,015 %, LH 0,02 %, FSH 0,01 %. Die Spezifität des auf die gleiche Art hergestellten hCG-B-Antiserums AS-hCG-B-32 (= Anti-hCG-B AS 16 IRE) wird ebenfalls als sehr hoch beschrieben: Kreuzreaktionen (im homologen Assay) mit hCG 0,05 %, mit hCG-alpha 0,005 %, mit LH 0,0025 % und mit LH-B ebenfalls 0,0025 %.

Nach unseren eigenen Untersuchungen war das Antiserum Anti-hCG AS 15 für hCG in Gegenwart von hCG-B als einziges Antiserum hochspezifisch (hCG-B-Kreuzreaktion 0,06 %). Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Autors fanden wir jedoch eine LH-Kreuzreaktion von 2,4 %. Dadurch ist die Möglichkeit der spezifischen hCG-Bestimmung trotz der niedrigen hCG-B-Kreuzreaktion eingeschränkt. Ausreichend hohe maximale Bindung von ^{125}I -hCG an dieses Antiserum erreichten wir nur dann, wenn der Tracer mit Hilfe der Lactoperoxidase-Methode hergestellt wurde (Morrison u. Bayse 1970, Souler et al. 1979). Umgekehrt war das auf die gleiche Weise hergestellte hCG-B-Antiserum von Reuter (Anti-hCG-B AS 16 IRE) in Gegenwart von LH sehr spezifisch (LH-Kreuzreaktion 0,01 %), nicht jedoch in Gegenwart von hCG (Kreuzreaktion 2,2 %).

Pandian et al. (1980) stellten einen gegen eine modifizierte β -Kette gerichteten, LH-immunabsorbierten hCG-B-Antikörper her (DS_5 -hCG-B-hem). Dieser hochspezifische Antikörper ist jedoch ebenfalls nicht allgemein erhältlich.

Durch die Anwendung sog. monoklonaler Antikörper konnte die Spezifität in letzter Zeit noch weiter verbessert werden (Berger et al. 1983, Schwarz et al. 1983). Diese Antikörper wurden nach der Technik von Köhler und Mill-

stein (1975) hergestellt. Dabei werden Mäuse - Myelomzellen und Plasmazellen von Mäusen, die vorher mit hCG immunisiert wurden, mittels dazu geeigneter Viren in vitro zur Fusion gebracht. Die entstehenden Hybridzellen besitzen das Genmaterial einer einzigen Plasmazelle und einer Myelomzelle, d.h. sie sind schnell vermehrungsfähige (Myelomzelle) Antikörperproduzenten (Plasmazelle). Auf Nährmedium werden aus diesen Hybridzellen homogene Zellpopulationen (Klone) gezüchtet, die aus identischen Zellen bestehen und deshalb hochspezifische Antikörper produzieren. Solche Antikörper standen uns jedoch noch nicht zur Verfügung.

Unter allen von uns untersuchten hCG- β -Antiseren wurden nur bei dem Antiserum der Firma Serono parallel verlaufende Standardverdrängungskurven für hCG, hCG- β und dem 2nd IRP-hCG beobachtet, d.h. selbst dann, wenn in der Probe hCG- β enthalten ist, wie dies z.B. bei 20 % der Patienten mit Hodentumoren der Fall ist, geht die β -Untereinheit quantitativ richtig in die Bestimmung mit ein. Die LH-Kreuzreaktion war mit 0,25 % niedrig und der Assay mit einer unteren Nachweisgrenze von 1,4 IU/l ausreichend empfindlich. Deshalb wird dieses Antiserum derzeit in unserem Labor für klinische Untersuchungen verwendet. In Zukunft wird man jedoch wahrscheinlich (monoklonale) Antikörper bevorzugen, die ausschließlich das dimere Hormon und nicht gleichzeitig die β -Untereinheit erfassen.

7.3. Referenzpräparate

Bisher wurde als Referenzpräparat das 2nd IRP-hCG (Bioassay) genutzt. Dieser Standard ist jedoch relativ stark mit Untereinheiten verunreinigt. Deshalb hat man sich An-

fang 1983 in der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie geeinigt, als neuen Standard den 1st IRP-hCG (Immunoassay) zu wählen, da dieser mit hCG-CR 119 identisch ist und einen höheren Reinheitsgrad besitzt (Vereinbarung Dtsch. Ges. für klinische Chemie 1983). Dabei entspricht 1 mg hCG im Immunoassay 8600 ± 700 IU MRC 75/537 (= 1st IRP hCG).

7.4. Physiologische Abklingrate von hCG in Vivo

Für Verlaufskontrollen von Patienten mit hCG-produzierenden Tumoren muß die physiologische Abklingzeit von hCG bekannt sein. Die zeitlichen Verläufe der hCG-Spiegel waren bei den von uns untersuchten Schwangeren post partum annähernd linear und fielen mit einer Halbwertszeit von 10-34 Stunden ab. Die Berechnung erfolgte nach der von Kohn (1979) beschriebenen Formel (Mann et al. 1980 b).

Andere Autoren fanden nach Injektion von hCG-Tracer Abklingraten zwischen 5,1 und 23,9 Stunden. Wide et al. (1968) ermittelten für radioaktives hCG, das nicht schwangeren Frauen verabreicht worden war Halbwertszeiten von 6-10 Stunden. Die MCR (Metabolic Clearance Rate) betrug 4 ml/Min; d.h. in einer Minute wurde die in 4 ml enthaltene hCG-Menge eliminiert. 21 % des injizierten hCG wurde über die Niere ausgeschieden. Rizkallah et al. (1969) konnten zwei verschieden rasch abklingende Komponenten nachweisen. Ein Teil des Hormons wurde in 5,1 h (Männer) und 5,3 h (Frauen) zur Hälfte eliminiert; die Halbwertszeit der zweiten, langsameren Komponente betrug 23,6 h (Männer) und 23,9 h (Frauen). Die MCR wird mit 3,38 l/Tag (Männer) und 3,86 l/Tag (Frauen) angegeben. Javadpour et al. (1978) fand eine hCG-Halbwertszeit von

24-36 Stunden.

Braunstein et al. (1972) ermittelten die hCG-Abklingrate im Tierversuch. Sie injizierten ^3H -markiertes Hormon und erhielten exponentiell verlaufende Abklingkurven mit schnellen und langsamen Komponenten, die ineinander übergingen. Die schnellen Komponenten betrugen für hCG 141 Min (2,35 h), für hCG-alpha 6,2 Min (0,13 h) und für hCG-B 11,1 Min (0,18 h).

Die langsamen Komponenten waren 725 Min (12,1 h) (hCG), 58 Min (0,96 h) (hCG-alpha) und 81 Min (1,35 h) (hCG-B). Untersuchungen, bei denen die Abklingrate mit markiertem Hormon ermittelt wird sind allerdings mit solchen bei denen der Verlauf post partum verfolgt wird nur bedingt zu vergleichen, da markiertes und unmarkiertes Hormon nicht identisch sind.

Lähteenmäki (1978) ermittelte die hCG-Halbwertszeit bei Patientinnen, die nach dem ersten Trimenon einen Abort erlitten hatten (N = 18). Er fand drei Komponenten mit unterschiedlichen Halbwertszeiten: 15 h, 27 h und 168 h. Diese langsame Komponente könnte durch noch vorhandenes hCG-produzierendes Restgewebe nach Interruptio verursacht worden sein.

Wehmann u. Nisula (1979) untersuchten die Clearance der hCG-Untereinheiten und fanden sowohl bei der alpha- als auch bei der β -Kette eine gegenüber hCG erhöhte MCR. Die Kurven setzten sich ebenfalls bei beiden Untereinheiten aus zwei verschiedenen Komponenten zusammen: Die langsame Komponenten betrugen 76 ± 19 Min (hCG-alpha) und 236 ± 41 Min (hCG-B), die Schnellen $13, \pm 0,9$ Min und $41,2 \pm 1,7$ Min.

Einen wesentlichen Einfluß auf die hCG-Clearance scheint der Kohlenhydratanteil zu haben: Die schrittweise Deglykosilierung des Hormons bewirkt eine Verkürzung der Halbwertszeit auf wenige Minuten. (Yoshimoto et al. 1979 u. 1977, Morell et al. 1971, Bahl et al. 1977.) Nach Morell et al. wird desialysiertes hCG wahrscheinlich aktiv in den Hepatozyten der Leber akkumuliert und dort metabolisiert.

Unsere Ergebnisse unterscheiden sich zu denen verschiedener Arbeitsgruppen vor allem durch den linearen Verlauf der Abklingkurve. Dies kommt vermutlich durch unterschiedliche Ausgangsbedingungen zustande, da sich der hCG-Spiegel bei Schwangeren bereits in einem Verteilungsgleichgewicht befindet, was bei einer hCG-Injektion bei Nichtschwangeren nicht der Fall ist. Hier wird i.v. verabreichtes Hormon relativ schnell in andere Verteilungsräume abwandern und deshalb zunächst eine schnelle Komponente der Abklingkurve vortäuschen. Unsere Halbwertszeit ist deshalb am ehesten mit der langsameren Komponente mancher Autoren vergleichbar.

7.5. Normalbereich von hCG und hCG- β

Der Normalbereich wurde bei gesunden Bundeswehrsoldaten im medianen Alter von 20 Jahren ermittelt (S. Ergebnisse Tab. 12). Er lag für hCG zwischen 0,5 und 2,4 IU/l und damit zum Teil unter der Nachweisgrenze des Anti-hCG- β RIAs. Der hCG- β -Normalbereich wurde im gleichen Kollektiv ermittelt und lag bei 0,1 - 0,5 μ g/l (Tab. 12).

Vaitukaitis et al. (1979) betrachten hCG-Werte unter 2 IU/l als normal; dabei wird zugrunde gelegt, daß 1 ng

hCG (Roussel) 5 mIU hCG (2^{nd} IRP) entsprechen. Nach unseren Ergebnissen entspricht 1 ng hCG 13 mIU hCG 2^{nd} IRP. Der von Vaitukaitis ermittelte hCG-Normalwert liegt somit höher als der von uns, was möglicherweise durch nicht ausreichende Spezifität des Antiserums SB 6 bedingt sein könnte.

Weintraub et al. (1973) geben folgende Normalwerte im Serum an: hCG 1 ng/ml, hCG- β 1 ng/ml. Gaspard u. Reuter (1980) kamen zu ähnlichen Ergebnissen: hCG 1 ng/ml und hCG- β 1,5 ng/ml.

Die Referenzkollektive für hCG bestanden aus 77 Patienten und 71 Patientinnen ohne tumoröse oder chronisch entzündliche Erkrankungen und mit normaler Nierenfunktion. Es wurden Median und Perzentilen, nach Altersgruppen gegliedert bestimmt (Tab. 12).

Die Werte zeigen, daß bei Männern Serumwerte über 3 IU/l und bei Frauen über 4 IU/l als pathologisch zu werten sind.

Zur Ermittlung des Referenzbereichs von hCG- β wurde ein Kollektiv von 80 Patienten und 83 Patientinnen ohne tumoröse oder chronisch entzündliche Erkrankungen mit normaler Nierenfunktion getestet. Dabei lagen alle Serumspiegel im Normalbereich.

7.6. Molekulare Heterogenität von hCG

Verschiedene Autoren haben unterschiedliche molekulare Formen von hCG und seinen Untereinheiten in Schwangeren (Good et al. 1977, Vaitukaitis et al. 1974), in

Körperflüssigkeiten und Tumorextrakten trophoplastischer und nichttrophoplastischer Tumoren (Fein et al. 1980, Hattori et al. 1980, Odell et al. 1977, Wehmann und Nisula 1980, Weintraub und Rosen 1973, Vaitukaitis et al. 1974, Yazaki et al. 1980) und in verschiedenen Zellkulturen beschrieben (Chou 1978, Hussa 1978, Tashjian 1973). Dabei gibt es sowohl Varianten des Protein- als auch des Kohlenhydratanteils (Benveniste et al. 1979, Lee et al. 1977, Weintraub et al. 1975).

Die Molekülstruktur von Schwangeren-hCG wurde mehrfach untersucht (Bahl et al. 1966, 1977 und 1978, Bellisario et al. 1973, Carlsen et al. 1973, Morgan et al. 1975). In der Primärstruktur beträgt das Molekulargewicht 38.000. Davon entfällt auf hCG-alpha etwa 15.000 und auf hCG-beta etwa 23.000. 33 % des Molekulargewichts nimmt der Kohlenhydratanteil ein.

Nach den Untersuchungen der o.g. Autoren scheint der Kohlenhydratanteil von hCG unterschiedlicher Herkunft strukturell erheblich zu variieren. Die Kohlenhydratzusammensetzung ist chemisch jedoch nur schwer zu analysieren. Durch Affinitätschromatographie an pflanzliche Lectine, von denen bekannt ist, welche Zucker sie binden, kann aber indirekt auf die Kohlenhydratstruktur geschlossen werden. Wir haben deshalb Bindungsstudien mit dem für diese Zwecke bekanntesten Lectin, dem trägergebundenen Concanavalin A (Con A) durchgeführt. Con A bindet Moleküle, die alpha-D-mannopyranosyl, alpha-D-glucopyranosyl und verwandte Reste enthalten. Diese Zucker können im Kohlenhydratanteil von hCG enthalten sein.

Bei den von uns durchgeführten Untersuchungen mit Con A-Sepharose wurde hCG aus Schwangerenserum zu 100 % gebun-

den. Im Gegensatz dazu zeigte hCG aus Tumorsemen von Hodentumorkranken ein sehr unterschiedliches Bindungsverhalten. Der durchschnittliche Bindungsgrad betrug 22 %. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, daß bei Hodentumoren unterschiedliche hCG-Varianten produziert werden. Aus der Literatur ist bekannt, daß hCG-Extrakte aus Tumorgewebe nur wenig an Con A binden, während SchwangerenhCG aus Urin und Serum fast vollständig bindet (Yoshimoto et al. 1979). Eine ebenfalls unvollständige Con A-Bindung wurde bei hCG aus Normalgewebsextrakten (Colon, Leber) beobachtet und auf seine veränderte Kohlenhydratzusammensetzung zurückgeführt (Braunstein et al. 1973 und 1979, Yoshimoto et al. 1977 und 1979). Im Gegensatz dazu wird zellständiges hCG aus Placentagewebe zu 90 % an Con A gebunden (Yoshimoto et al. 1979).

Die Höhe des hCG-Spiegels im Serum ist unter anderem von 2 Faktoren abhängig: Sekretion und Elimination. Die Eliminationsgeschwindigkeit wird z.T. durch den Glykosylierungsgrad beeinflußt. Bahl et al. (1977) und Morell et al. (1971) konnten nachweisen, daß die hCG-in vivo-Abklingrate durch schrittweise Deglykosylierung von mehreren Stunden auf wenige Minuten zurückgeht. Möglicherweise wird nicht - oder nur geringfügig - glykosyliertes hCG in höherem Ausmaß in den Kreislauf sezerniert (Eagon et al. 1977, Blobel et al. 1975) als bisher angenommen, erreicht aber durch die kurze Halbwertszeit im Serum keinen meßbaren Serumspiegel. Dies könnte erklären, warum gelegentlich bei Hodentumoren im Gewebe durch Immunperoxidasefärbung hCG nachgewiesen werden konnte, diese Patienten aber serologisch-radioimmunologisch hCG-negativ waren (Habilitationsschrift P.D. Dr. Mann, Seite 192). Da nach Braunstein et al. (1975) hCG hauptsächlich über die Niere ausgeschieden wird, bleibt zu untersuchen, ob bei serolo-

gisch hCG-negativen Hodentumorpapienten mit hCG-positiver Gewebshistologie der hCG-Nachweis aus dem Urin mit Hilfe von Anreicherungsverfahren eher gelingt als aus dem Serum (Javadpour et al. 1981).

8. Zusammenfassung

Die radioaktive Markierung von hCG und die angegebenen Reinigungsverfahren von ^{125}I -hCG und ^{125}I -hCG- β ergab Tracer mit hoher spezifischer Bindung an homologe und heterologe Antiseren. Der Substitutionsgrad betrug 1 Jodatom pro Hormonmolekül. Aufgrund der guten Stabilität der Tracer können sie bis zu 50 Tagen verwendet werden.

Die Spezifität des z. Zt. am häufigsten verwendeten Antiserums Anti hCG- β SB 6 (NIAMDD) war mit einer LH-Kreuzreaktion von 5,5 % im heterologen RIA-System nicht ausreichend. Die Affinität dieses Antiserums zu hCG und hCG- β unterschied sich sowohl im homologen wie im heterologen System, d.h. die Standardverdrängungskurven dieser beiden Reinsubstanzen verliefen nicht parallel. Als Einziges der untersuchten hCG- β -Antiseren wies das Antiserum der Firma Serono parallele Standardverdrängungskurven für hCG, hCG- β und 2^{nd} IS-hCG auf. Dieses Antiserum war in der Gegenwart von LH, FSH und TSH hochspezifisch (LH-Kreuzreaktion unter 1 %). Mit allen sog. hCG- β Radioimmunoassays wurden gleichzeitig hCG und die monomere hCG- β -Untereinheit erfaßt. Nur das von Reuter et al. (1974) hergestellte hCG-Antiserum Anti-hCG AS 15 IRE war in Gegenwart von hCG- β hochspezifisch. Seine LH-Kreuzreaktion betrug 2,2 %. Für klinische Routinezwecke verwenden wir das Antiserum der Firma Serono im heterologen Assaysystem. Die Sensitivität des RIA-Systems ^{125}I -hCG/Anti-hCG- β Serono/ 2^{nd} IS betrug $1,4 \pm 1,2 \text{ IU/l}$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $N = 100$). Der spezifische Nachweis der freien β -Kette gelingt derzeit am Besten mit einem von Reuter et al. (1974) hergestellten Anti-hCG- β Antiserum (Anti-hCG- β AS 16 IRE).

Die Präzision der Radioimmunoassays lag im üblichen Be-

reich. Die Auswertung der Assays erfolgte maschinell am Rechner 4004 Siemens mittels Spline-Funktion.

In Seren von Patienten mit malignen Hodentumoren konnte durch Chromatographie an Con A-Sepharose eine molekulare Heterogenität von hCG hinsichtlich des Kohlenhydratanteils nachgewiesen werden. Tumor-hCG band nur unvollständig an Con A, während hCG in Schwangerenserum vollständig und hCG im Fruchtwasser zu ca. 95 % an Con A banden.

Die physiologische Abklingzeit von hCG in Schwangerenserum wurde zu 10 - 36 h ermittelt.

9. Literaturverzeichnis

Bahl OP, J. Biol. Chem. 244 : 575-583 (1969)

Bahl OP, Carlsen RB, Bellisario R, Swaminathan N (1972) Human chorionic gonadotropin: Amino acid sequence of the alpha- and β -subunits. Biochem. Biophys. Res. Comm. 48 : 416-422

Bahl OP (1973) In: Hormonal Proteins and Peptides, edited by CH Li, New York Academic, p. 171-199

Bahl OP (1977) Human chorionic gonadotropin, its receptor and mechanism of action. Fed. Proc. 36 : 2119-2127

Bahl OP, März L, Kessler MJ (1978) Isolation and characterization of N- and O-glycosidic carbohydrate units of human chorionic gonadotropin. Biochem. Biophys. Res. Comm. 84 : 667-676

Bell JJ, Canfield RE, Scienna JJ (1969) Purification and characterization of human chorionic gonadotropin. Endocrinology 84 : 298-307

Bellisario R, Carlsen R, Bahl OP (1973) Human chorionic gonadotropin. Linear amino acid sequence of the alpha-subunit. J. Biol. Chem. 248 : 6796-6809

Bellisario R, Carlsen RB, Bahl OP (1975) J. Biol. Chem. 250 : 3837-3844

Benveniste R, Helman JD, Orth DN, McKenna TJ, Nicholson WE, Rabinowitz D (1979) Circulation big human prolactin: Conversion to small human prolactin by reduction of disulfide bonds. J. Clin. Endocrinol. Metab. 48 : 883-886

Berger P, Schwarz S, Wick G (1983) Analysis of chorioncarcinoma cell line products by monoclonal antibodies against hCG using the IRMA technique. Institute of general and experimental pathology, university of insbruck, austria

Blobel G, Dobberstein B (1975) Transfer of proteins across membranes. J. Cell. Biol. 67 : 835

Bolton AE (1979) Proteinmarkierungstechniken, Review 18, Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig, S. 18

Braunstein GD, Kamdar V, Rasor J, Swaminathan N, Wade ME (1979) Widespread distribution of a chorionic-gonadotropin-like substance in normal human tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49 : 917

Braunstein GD, Rasor J, Wade ME (1975) Presence in normal human testes of a chorionic-gonadotropin-like substance distinct from human luteinizing hormone. *N. Engl. J. Med.* 193 : 1339-1342

Braunstein GD, Vaitukaitis JL, Carbone PP, et al. (1973) Ectopic production of human chorionic gonadotropin by neoplasms. *Ann. Intern. Med.* 78 : 39

Braunstein GD, Vaitukaitis JL, Ross GT (1972) The in vivo behavior of human chorionic gonadotropin after dissociation in subunits. *Endocrinology* 91 : 1030

Butt WR (1972) *J. Endocrinol.* 55 : 453

Carlsen RB, Bahl OP, Swaminathan N (1973) Human chorionic gonadotropin linear amino acid sequence of the β -subunit. *J. Biol. Chem.* 248 : 6810-6827

Chen HC, Hodgen GD, Matsuura S, Lin LJ, Gross E, Reichert LE, Birken S, Canfield RE, Ross GT (1976) Evidence for a gonadotropin from nonpregnant subjects that has physical, immunological and biological similarities to human chorionic gonadotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 : 2885

Chou JY (1978) Establishment of clonal human placental cells synthesizing human chorionic gonadotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 : 1854-1858

Closset J, Hennen G, Leguin RM (1973) Human luteinizing hormone. The amino acid sequence of the subunit. *FEBS Lett* 29 : 97-100

Eagon PK, Heath EC (1977) Glycoprotein biosynthesis in myeloma cells. *J. Biol. Chem.* 252 : 2372

Fein HG, Rosen SW, Weintraub BD (1980) Increased glycosylation of serum human chorionic gonadotropin and subunits from eutopic and ectopic sources: Comparison with placental and urinary forms. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50 : 1111

Felber JP (1974) Radioimmunoassays. In: *Clinical Biochemistry-Principles and Methods*. Ed.: Curtins HC, Roth M, 327-367, Verlag de Gruyter, Berlin

Ferguson KM, Jeffcoate SL (1979) The effect of purity of LH-tracer on the radioimmunoassays of LH in human serum. *Acta endocr. suppl.* 225 : 130

Fraker PJ, Speck JC jr. (1976) 1,3,4,6-Tetrachloro-3-alpha, 6alpha-Diphenylglycoluril, a usefull reagent for labelling proteins with ^{125}I . *Pierce Iodo-Gen TM*

Gaspard UJ, Reuter AM, Deville JL, Vrindts-Gevaert Y, Bagshawe KD, Franchimont P (1980) Serum concentration of human chorionic gonadotropin and its alpha and beta subunits. 2. Trophoblastic tumors. *Clin. Endocrinology* 13 : 319-329

Good A, Ramos-Urbe M, Ryan RJ, Kempers RD (1977) Molecular forms of human chorionic gonadotropin in serum, urine and placental extracts. *Fertil. Steril.* 28 : 846

Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS (1963) The preparation of ^{131}I -labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89 : 114

Hales CN, Randle PJ (1963) *Biochem. J.* 88 : 137

Hattori M, Yoshimoto Y, Matsukara S, Fujita T (1980) Qualitative and quantitative analyses of human chorionic gonadotropin and its subunits produced by malignant tumors. *Cancer* 46 : 355-361

van Hell H, Matthijsen R, Homan JDH (1968) Studies on human chorionic gonadotropin. I. Purification and some physio-chemical properties. *Acta Endocrinol.* 59 : 89

Huber W, Mann K, Karl HJ (1979) Anwendung eines Computer-programmes zur Berechnung radioimmunologischer Meßwerte. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 17 : 241-246

Hussa RO, Pattillo RA, Ruckert ACF, Scheuermann KW (1978) Effects of butyrate and dibutyryl cyclic AMP on hCG-secreting trophoblastic cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 46 : 69-76

Javadpour N, Chen HC (1981) Improved human chorionic gonadotropin detection with carboxyterminal radioimmunoassay of beta-subunit on concentrated 24-hour urine in patients with testicular cancer. *J. Urol.* 126 : 176

Javadpour N, McIntire RK, Waldmann TA, Scardino PT, Bergmann S, Anderson T (1978) The role of the radioimmunoassay of serum alphafetoprotein and human chorionic gonadotropin in the intensive chemotherapy and surgery of metastatic testicular tumors. *J. Urol.* 119 : 759-762

Kardana A, Bagshawe KD (1976) A rapid, sensitive and specific radioimmunoassay for human chorionic gonadotropin. *J. Immunol. Meth.* 9 : 297-305

Kawamura J, Machida S, Yoshida O, Oseko F, Imura H, Hattori M (1978) Bladder carcinoma associated with ectopic production of gonadotropin. *Cancer* 42 : 2773-2780

Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256 : 495-497

Kohn J (1979) The value of apparent half-life assays of alphafetoprotein in the management of testicular teratoma. In: *Carcino-Embryonic Proteins Vol. II*, Ed., Lehmann FG, Elsevier/North-Holland, Biomedical Press : 383-386

Lahteenmäki P (1978) The disappearance of hCG and return of pituitary function after abortion. *Clin. Endocr.* 9 : 101-112

Lee CY, Wong S, Lee SK, Ma L (1977) Purification and properties of choriongonadotropin from human term placenta. *Z. Physiol. Chem.* 358 : 909-914

Louvet JP, Nisula BC, Ross GT (1975) Method of extraction of glycoprotein hormones from plasma for use in radioimmunoassays. *J. Lab. Clin. Med.* 86 : 883-886

Mann K (1981) Humanes Choriongonadotropin und seine Untereinheiten bei Keimzelltumoren des Hodens. Bestimmungsmethoden und klinische Bedeutung. Habilitationsschrift aus der Medizinischen Klinik II der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Großhadern (Direktor: Prof. Dr. med. G. Paumgartner)

Mann K, Göring W, Lipp W, Keipert B, Karl HJ, Geiger R, Fink E (1980 a) Radioimmunoassay of human urinary kallikrein. Determination of human urinary kallikrein II. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 18 : 395-401

Mann K, Lamerz R, Hellmann T, Kümper JH, Staehler G, Karl HJ (1980 b) Use of human chorionic gonadotropin and alpha-fetoprotein radioimmunoassays: Specificity and apparent half-life determination after delivery and in patients with germ cell tumours. *Oncodevelopmental Biology and Medicine* 1 : 301-312

Marschner I, Dobry IH, Erhardt FW, Landesdorfer T, Popp B, Ringel C, Scriba PC (1974) Berechnungen radioimmunologischer Meßwerte mittels Spline Funktion. *Arztl. Lab.* 20 : 184-191

Matsuura S, Chen HC, Hodgen GD (1978) Antibodies to the carboxyl-terminal Fragment of hCG- β subunit: characterization of antibody-recognition sites using syntetic peptide analogues. *Biochemistry* 17 : 575-580

Merz WE, Dörner M (1983) Iodinated choriogonadotropin (hCG): Biological, physical and immunological investigations. *Acta endocr.* 102 : 51-52

Merz WE, Hilgenfeldt U, Dörner M, Brossmer R (1974) Biological, immunological and physical investigations on human chorionic gonadotropin. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 355 : 1035-1045

Miyachi Y, Vaitukaitis JL, Nieschlag E, Lipsett MB (1972) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 34 : 23

Monteiro LCMP, Barker G, Ferguson KM, Wiltshaw E, Neville AM (1983) Ectopic production of hCG and hPL by ovarian carcinoma. *Eur. J. Cancer and Clin. Oncol.* 19 : 173-178

Morell AG, Gregoriadis G, Scheinberg IH, Hickman J, Ashwell G (1971) The Role of Sialic Acid determining the Survival of Glycoproteins in the Circulation. *J. Biol. Chem.* 246 : 1461-1467

Morgan FJ, Birken S, Canfield RE (1975) The amino acid sequence of human chorionic gonadotropin. The alpha subunit and the beta subunit. *J. Biol. Chem.* 250 : 5247-5259

Morgan CR, Lazarow A (1963) *Diabetes* 12 : 115

Morrison M, Bayse GS (1970) Catalysis of Iodination by Lacto-peroxidase. *Biochem* 9 : 2995-3000

Odell W, Wolfson A, Yoshimoto Y, Weitzmann R, Fisher D (1977) Ectopic peptide synthesis: A universal concomitant of neoplasma. *Trans Assoc. Am. Physicians* 90 : 204-227

Pandian MR, Mitra R, Bahl OP (1980) Immunological properties of the β -subunit of human chorionic gonadotropin (hCG). II Properties of a hCG-specific antibody prepared against a chemical analog of the β -subunit. *Endocrinology* 107 : 1564

Papapertou PD, Sakarelou NP, Braouzi H, Fessas P (1980) Ectopic production of human chorionic gonadotropin (hCG) by neoplasms: The value of measurements of immunoreactive hCG in the urine as a screening procedure. *Cancer* 45 : 2583

Redshaw MR, Lynch SS (1974) J. Endocrinol. 60 : 527

Reuter AM, Schoonbrood J, Franchimont P (1974) Specific radioimmunoassay of hCG and its alpha and β subunits. Br. J. Cancer 30 : 237-259

Reuter AM, Schoonbrood J, Franchimont P (1976) Specific radioimmunoassay of hCG and its alpha and β subunits: Methods and results. In: Methods and results. Cancer related antigens Ed. by P. Franchimont. Excerpta Medica, North Holland, Amsterdam, New York 237-250

Rizkallah T, Guspi E., van de Wiele RL (1969) Metabolism of hCG in Man. J. Clin. Endocr. 29 : 92

Rutanen EM, Seppälä M (1978) The hCG- β subunit radioimmunoassay in nontrophoblastic gynecologic tumors. Cancer 41 : 692-696

Saaman NA, Smith JP, Rutledge FN, Schultz PN (1976) The significance of measurement of human placental lactogen, human chorionic gonadotropin and carcinoembryonal antigen in patient with ovarian carcinoma. Am. J. Obstet. Gynecol. 126 : 186-189

Saxena BB (1980) Criteria for clinical value measurement of human chorionic gonadotropin. Research in reproduction 12, No 4

Saxena BB, Rathnam P (1976) J. Biol. Chem. 251 : 993-1005

Schüssler B, Schmitt-Gollwitzer M, Nevinny-Stickel J (1978) Anwendbarkeit eines hochsensitiven hCG- β -Radioimmunoassays zum Screening von hCG-produzierenden Tumoren. Lab. med. 2 : 128

Schwarz S, Berger P, Wick G (1983) The immunological "surface" of the hCG-molecule: Mapping by 21 monoclonal antibodies. Medical School, University of Innsbruck, Austria

Seppälä M, Lehtovirta P, Rutanen EM (1978) Detection of chorionic gonadotropin-like activity in infertile cycles with a short luteal phase. Acta Endocrinol. 88 : 164-168

Seppälä M, Rutanen EM, Stenman UH (1976) CEA and hCG in nontrophoblastic tumors of the female genital tract: A discordant expression. Fishman WH, Shells S, ed. Onco-developmental gene expression, New York, Academic Press 445-448

Shome B, Parlow AF (1973) The primary structure of the hormone specific β -subunit of human pituitary luteinizing hormone (hLH). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 36 : 618-621

Shome B, Parlow AF (1974) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39 : 203-205

Souler D, Tyrey L, Hammond CB (1979) The utility of a rapid assay of human chorionic gonadotropin in the management of trophoblastic disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 135 : 384-392

Tashjian AH, Weintraub BD, Barowsky NJ, Rabson AS, Rosen SW (1973) Subunits of human chorionic gonadotropin: Unbalanced synthesis and secretion by clonal cells strains derived from a bronchogenic carcinoma. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 5 : 1419-1422

Thorell JJ, Johansson BG (1972) Structure-activity relationships of protein and polypeptide hormones, part 2. In: Margoulies and FC Greenwood eds. p 531, *Excerpta Medica Foundation, Amsterdam*

Tyrey L, Hammond CB (1975) The hCG- β subunit radioimmunoassay: Potential error in hCG-measurement related to choice of labeled antigen. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 125 : Nõ 2 160

Vaitukaitis JL (1974) Changing placental concentrations of human chorionic gonadotropin and its subunits during gestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38 : 755

Vaitukaitis JL (1979) Human chorionic gonadotropin - a hormone secreted for many reasons. *New Engl. J. Med.*, Aug 9, 324

Vaitukaitis JL, Robbins JB, Nieschlag E, Ross GT (1971) A method for producing specific antisera with small doses of antigen. *J. Clin. Endocrinol.* 33 : 988

Wehmann RE, Nisula BC (1980) Characterisation of a discrete degradation product of the human chorionic gonadotropin β -subunit in humane. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51 : 101

Wehmann RE, Nisula BC (1979) Metabolic clearance rates of the subunits of human chorionic gonadotropin in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 48 : 753

Weintraub BD, Krauth G, Rosen SW, Rabson AS (1975) Differences between purified ectopic and normal alpha subunits of human glycoprotein hormones. *J. Clin. Inv.* 56 : 1043

Weintraub BD, Rosen SW (1973) Ectopic production of the isolated beta subunit of human chorionic gonadotropin. *J. Clin. Invest.* 52 : 3135-3142

Wide L, Johansson E, Tillinger KG, Diczfalusy E (1968) Metabolic clearance of human chorionic gonadotropin administered to nonpregnant women. *Acta endocrin.* 59 : 579-594

Wood WG, Wachter Chr, Scriba PC (1980) Comparison of ^{125}I -labelling of polypeptides using chloramin-T and 1,3,4,6-Tetra-chloro- 3-alpha-Diphenyl- Glycoluril (Iodogen) with subsequent separation of iodide and labelled protein on cation- exchange dextran. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 301 : 119

Yazaki C, Wakabayashi K, Igarashi M (1980) Isoelectric heterogeneity of human chorionic gonadotropin - presence of choriocarcinoma specific components. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 138 : 189-194

Yoshimoto Y, Wolfson AR, Odell WD (1979) Glycosylation, a variable in the production of hCG by cancers. *Am. J. of Med.* 67 : 414

Yoshimoto Y, Wolfson AR, Odell WD (1977) Human chorionic gonadotropin- like substance in nonendocrine tissue of normal subjects. *Science* 197 : 575

Herrn Prof. Dr. G. Paumgartner danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes an seinem Institut.

Herrn Prof. Dr. H.J. Karl gilt mein Dank für die Überlassung des Themas.

Herrn Priv. Doz. Dr. K. Mann gilt mein besonders herzlicher Dank. Er führte mich in experimentelle Arbeitsmethoden ein und förderte das Entstehen dieser Arbeit durch zahlreiche Hinweise und wertvolle Ratschläge.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen und Assistenten, besonders Frau Hammerl, danke ich für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Versuche.

Meiner lieben Frau Eva danke ich für die private Unterstützung und Geduld, die sie mir während der Durchführung der Arbeit entgegengebracht hat.

Lebenslauf

Name: Thomas Hellmann

Geboren: 1. Juni 1949 in München

Eltern: Kurt Hellmann, Rechtsanwalt
Ruth Hellmann

Schulzeit: 1957-1961 Volksschule Planegg
1961-1972 Kurt-Huber-Gymnasium
Gräfelfing
1972 Abitur

Hochschulzeit 1973-1980 Studium der Humanmedi-
zin, Ludwig-Maximilian-Universi-
tät, München

Abschluß: 1980 Staatsexamen
1980 Approbation

Ärztliche Tätigkeit: 1980, November bis 1981, Juli As-
sistent in der Herzchirurgischen
Klinik der LMU, Klinikum Großha-
dern, Direktor Prof. Klinner.
Seit August 1981 Assistent im In-
stitut für Anästhesiologie und In-
tensivmedizin der LMU, Klinikum
Großhadern, München, Direktor
Prof. K. Peter.

Seit 1982 verheiratet mit Eva-Marie Hellmann
geb. Steiner.

1982 Geburt unseres Sohnes David-Maxi-
milian.

